

LARISSA REIFUR

**PREVALÊNCIA DE FILARIOSES EM CÃES DO LITORAL
PARANAENSE, PARANÁ, BRASIL:
DESTAQUE PARA A *Dirofilaria immitis***

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade
Federal do Paraná.

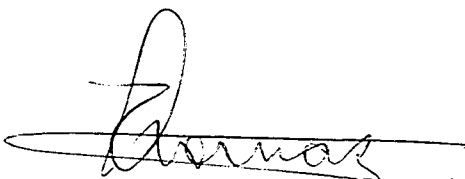
Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Vanete Thomaz Soccol
Co-orientador: Prof. Fabiano Montiani Ferreira

CURITIBA
2000

LARISSA REIFUR

**PREVALÊNCIA DE FILARIOSES EM CÃES DO LITORAL PARANAENSE,
PARANÁ, BRASIL:
DESTAQUE PARA A *Dirofilaria immitis***

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do
Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol – UFPR
Presidente/Orientadora



Profa. Dra. Ana Leuch Lozovei – UFPR
Membro Efetivo



Prof. Dr. Ennio Luz – UFPR
Membro Efetivo

Curitiba, 07 de Janeiro de 2000

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Irene e Nilo Reifur.

Canine heartworm disease is an area of continued interest and research. The results are often contrary to conventional thinking and wisdom. The everchanging knowledge has made more than one person lament.

“Half of what we know about heartworms is wrong; we just do not know which half yet.”

Ray Dillon, 1984

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e aos meus irmãos, que me ajudaram em todos os momentos, até nas colheitas de sangue.

Ao Rafael Reifur (Iti) e ao Paulo Eduardo Saches (Duda), pois fizeram das colheitas de sangue uma aventura inesquecível.

Ao Fabiano Montiani-Ferreira, pelo auxílio desde a idéia do trabalho até a sua finalização e por tudo.

À Profa. Dra. Vanete Thomaz-Soccol, pela orientação, conselhos, amizade e perseverança.

À Merial Saúde Animal, por ter cedido os testes Witness Dirofilaria.

Ao Médico Veterinário Takashi Yotsumoto e aos técnicos Agda Lemos e Luciano Maurício Mantovani da Vigilância Sanitária da Prefeitura de Pontal do Paraná, pela colaboração durante a fase de campo e pela amizade.

Ao Médico Veterinário Ermínio de Paula Molinari, da Vigilância Sanitária da Prefeitura de Guaratuba, pela assistência durante a fase de campo.

À Andrea Paplauskas, pela gentileza de emprestar um livro muito importante que enriqueceu meus conhecimentos e auxiliou na confecção da dissertação.

À aluna Samantha Luiza de Araújo, pela ajuda nos exames laboratoriais e na realização das colheitas de sangue.

Aos alunos que me auxiliaram em algumas colheitas de sangue como: Daniele B. Otto, Fernão Diego de Souza Lopes, Flávia de Mello Wolff, Tânia B. Monaco Martins, Catarina Nobre Lopes, Élcio Rene Crepaldi e aos outros que, por ventura tenha esquecido.

À professora Clotilde de Lourdes Branco Germiniani, pelo incentivo inicial.

Ao Médico Veterinário Ubiratã Assis Teixeira da Silva, por ter emprestado o suporte e as membranas filtro para a realização do teste de filtração.

Ao IBAMA, por ter cedido o alojamento em Guaraqueçaba durante a pesquisa de campo naquele local.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em nome da Profa. Alessandra Quaggio Augusto, pelos exames radiográficos e ultra-sonográficos dos cães da pesquisa.

Ao Prof. Milton Andriguetto, por ter cedido o mapa do litoral paranaense.

Ao Vinícius Abilhoa, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao SIMEPAR, por ter fornecido os valores das temperaturas no litoral, durante o período da colheita de sangue.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral	5
2.2 Objetivos específicos	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - GENERALIDADES SOBRE A <i>Dirofilaria immitis</i>	7
3.1 Posição taxonômica	7
3.2 Descrição morfológica	7
3.3 Ciclo biológico	8
3.4 Hospedeiros acidentais	10
3.5 Epidemiologia	13
3.6 Periodicidade das microfilárias sanguíneas	19
3.7 Mosquitos vetores	20
3.8 Fisiopatologia e sinais clínicos	26
3.8.1 Aspectos Hematológicos	32
3.8.2 Aspectos Imunológicos	33
3.9 Diagnóstico	34
3.10 Tratamento e Profilaxia	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 Delineamento experimental	54
4.2 Local da realização da pesquisa	55
4.3 Seleção dos animais da pesquisa	58
4.4 Cadastro dos animais da pesquisa	59
4.5 Período das colheitas de sangue	60
4.6 Colheita e armazenamento do sangue	60
4.7 Técnicas laboratoriais	61
4.7.1 Exame direto do sangue	61
4.7.2 Teste de Knott (1939) modificado por Newton e Wright (1956)	62
4.7.3 Teste de filtração	64
4.7.4 Teste imunológico para a pesquisa de antígeno da <i>Dirofilaria immitis</i>	66
4.7.5 Exames radiográficos e ultra-sonográficos	67
5 RESULTADOS	68
5.1 Resultados obtidos por meio de diferentes métodos diagnósticos	69
5.1.1 Anamnese e exame físico	69
5.1.2 Exame direto do sangue a fresco	70
5.1.3 Teste de Knott modificado	72
5.1.4 Teste de Filtração	78
5.1.5 Teste imunológico para a pesquisa de antígeno da <i>Dirofilaria immitis</i>	79

5.1.6 Exames radiográficos e ultra-sonográficos	82
5.1.7 Resultados gerais envolvendo os dados obtidos por meio das metodologias diagnósticas empregadas na pesquisa	85
5.2 Resultados obtidos por área de estudo	88
6 DISCUSSÃO	91
6.1 Eficiência das diferentes metodologias utilizadas	91
6.1.1 Anamnese e exame físico dos animais	91
6.1.2 Testes que detectam microfilárias no sangue	93
6.1.3 Testes imunológicos	101
6.1.4 Exames radiográficos e ultra-sonográficos	105
6.2 Alguns dados epidemiológicos observados no litoral do Paraná, com relação às áreas de estudo	107
7 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes que detectam o antígeno da <i>Dirofilaria immitis</i> , disponíveis nos EUA para o diagnóstico de dirofilariose.	41
Tabela 2 – Classificação da severidade da dirofilariose em cães, com base nos sinais clínicos, radiográficos e nas alterações clinicopatológicas.	50
Tabela 3 – Número total de cães (machos e fêmeas) selecionados para a pesquisa realizada no litoral do estado do Paraná.	68
Tabela 4 - Caracterização da pelagem dos cães da pesquisa, com relação à cor. Os cães selecionados possuíam pelagem clara, mista ou escura.	256 68
Tabela 5 - Caracterização da pelagem dos cães da pesquisa, com relação ao tipo. Os cães selecionados estão classificados em possuírem pelagem curta, média ou longa.	256 68
Tabela 6 - Caracterização dos hábitos noturnos e diurnos dos cães da pesquisa. Os cães foram enquadrados em três situações: 24 horas fora de casa; aproximadamente 24 horas dentro de casa ou período noturno dentro de casa.	256 69
Tabela 7- Estimativa da renda mensal das famílias dos cães da pesquisa. As famílias dos 256 cães selecionados enquadram-se em possuírem 1 a 3 salários mínimos, 4 a 6, 7 a 9 ou mais de 10 salários mínimos.	256 69
Tabela 8 – Número de amostras sangüíneas positivas ao exame direto com relação ao número total de amostras sangüíneas examinadas.	70
Tabela 9 – Número de cães machos e fêmeas (n = 31) que revelaram resultado positivo ao exame direto do sangue.	71
Tabela 10 – Movimentos executados pelas microfilárias detectadas ao exame direto do sangue de 31 amostras.	71
Tabela 11 – Número de amostras sangüíneas positivas ao teste de Knott modificado com relação ao número total de amostras sangüíneas examinadas.	72
Tabela 12 – Número de cães machos e fêmeas (n = 71) que revelaram resultado positivo ao teste de Knott modificado.	72
Tabela 13 – Tamanhos máximo, mínimo e médio dos três grupos de microfilárias obtidos por meio do teste de Knott modificado (n = 71).	73
Tabela 14 – Conformação da extremidade posterior das microfilárias dos três grupos obtidos por meio do teste de Knott modificado (n = 71).	74
Tabela 15 – Conformação da extremidade anterior das microfilárias dos três grupos obtidos por meio do teste de Knott modificado (n = 71).	74
Tabela 16 - Número de amostras sangüíneas examinadas ao teste de filtração do sangue e número de amostras com resultado positivo a este teste.	78
Tabela 17 – Número de cães machos e fêmeas (n = 80) que revelaram resultado positivo ao teste de filtração do sangue.	78
Tabela 18 – Número de cães que apresentou microfilárias de <i>Dipetalonema reconditum</i> , <i>Dirofilaria immitis</i> ou de outro parasito da superfamília Filarioidea, após a realização dos testes Knott e filtração (n = 80).	79
Tabela 19 - Número de cães com resultados positivos aos testes imunológicos Witness® e Snap®.	80

Tabela 20 - Número de animais amicrofilarêmicos que apresentaram antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> ao teste imunológico (Snap®).	80
Tabela 21 - Número de cães machos e fêmeas que apresentaram antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> ao teste imunológico (n = 14).	81
Tabela 22 - Número de animais, dispostos em três faixas etárias, que apresentaram antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> ao teste imunológico (n = 14).	81
Tabela 23 - Características da pelagem dos cães que apresentaram antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> ao teste imunológico (n = 14).	81
Tabela 24 - Características da pelagem dos cães que apresentaram antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> ao teste imunológico (n = 14).	81
Tabela 25 - Comparação entre o número total de cães fêmeas selecionadas para a pesquisa, número de fêmeas não infectadas e número de fêmeas infectadas por <i>Dipetalonema reconditum</i> , <i>Dirofilaria immitis</i> ou por outro parasito da superfamília Filarioidea.	82
Tabela 26 - Comparação entre o número total de cães machos selecionados para a pesquisa, número de machos não infectados e número de machos infectados por <i>Dipetalonema reconditum</i> , <i>Dirofilaria immitis</i> ou por outro parasito da superfamília Filarioidea.	82
Tabela 27 - Número total de cães, número de cães machos e de fêmeas, estudados em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense.	88
Tabela 28 - Número de amostras com resultados positivos aos exames que detectam microfilárias sangüíneas (exame direto, teste de Knott modificado, teste de filtração) detectadas em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense (n = 256).	89
Tabela 29 - Número de amostras com resultados positivos para <i>Dirofilaria immitis</i> (presença de microfilárias ao teste de filtração ou de antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> aos testes imunológicos) detectadas em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense (n = 256).	89

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo biológico da *Dirofilaria immitis* _____ 11
2. Mapas do Brasil, do estado do Paraná e do litoral paranaense. As regiões estudadas na pesquisa são: A) Guaraqueçaba, B) Antonina, C) Morretes, D) Pontal do Paraná (1. Pontal do Sul, 2. Ipanema, 3. Shangrilá, 4. Praia de Leste), E) Matinhos, F) Guaratuba, G) Ilha das Peças, H) Ilha do Mel. _____ 57
3. Esquema representativo do suporte e da membrana filtro, utilizados no teste de filtração do sangue _____ 65
4. Microfilária detectada ao exame direto do sangue. A figura representa o "movimento serpentiforme" da microfilária, caracterizado em 83,9% das amostras sangüíneas (objetiva de 20x) _____ 77
5. Microfilárias de *Dipetalonema reconditum*, fixadas em formalina a 2% e coradas por azul de metileno. A) caracterização da extremidade anterior larga e dotada de gancho (objetiva de 40 x); B) caracterização da extremidade anterior larga e posterior em forma de gancho (objetiva de 20 x). _____ 77
6. Microfilárias de *Dirofilaria immitis*, fixadas em formalina a 2% e coradas por azul de metileno. A) caracterização da extremidade posterior reta e anterior afilada (objetiva de 20 x), B) caracterização da extremidade anterior dotada de espaço cefálico (fenda) (objetiva de 40 x) _____ 77
7. Microfilária de parasito da superfamília Filarioidea, fixada em formalina a 2% e corada por azul de metileno. Caracterização da extremidade anterior afilada e com um pequeno gancho e extremidade posterior reta (objetiva de 30 x) _____ 77
8. Testes Witness® realizados com duas amostras sangüíneas diferentes. A) demonstra resultado positivo, caracterizado pela primeira linha rosa. A segunda linha rosa representa o controle positivo; B) teste demonstra resultado negativo _____ 84
9. Testes Witness® e Snap® realizados com amostras sangüíneas provenientes do mesmo cão. A) teste Witness® demonstra resultado negativo; B) teste Snap® demonstra resultado positivo, com pequena concentração antigênica, caracterizada pela presença de uma marca azul. A marca azul inferior representa o controle positivo _____ 84
10. Imagens radiográficas de dois cães positivos à pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis* no sangue. A) radiografia torácica ventrodorsal do cão número 1, microfilarêmico e sintomático. As alterações envolvem aumento ventricular direito; tortuosidade e maior radiopacidade das artérias pulmonares lobares caudais e proeminência da artéria pulmonar principal. B) radiografia torácica ventrodorsal do cão número 2, amicrofilarêmico e assintomático. As estruturas alteradas são as mesmas do cão 1, entretanto, no cão 2 elas são sutis _____ 84
11. Imagens ultra-sonográficas do coração de dois cães positivos à pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis* no sangue. A) imagem ultra-sonográfica em corte longitudinal do coração do cão número 1, microfilarêmico e sintomático, demonstrando aumento do

ventrículo direito, e a presença de pequenos focos hipereecóicos próximos à parede ventricular. B) imagem ultra-sonográfica do coração do cão número 2, amicrofilarêmico e assintomático, demonstrando o aumento ventricular direito_____84

12. Número de cães com resultados positivos aos testes que detectam microfilárias no sangue. Os resultados são totais, incluindo as três diferentes microfilárias detectadas_____85
13. Comparação do número de cães com resultados positivos aos testes que detectam microfilárias de *Dirofilaria immitis* com relação ao número de cães positivos aos testes imunológicos, para a presença de antígenos de *Dirofilaria immitis*, pesquisados no sangue dos cães da pesquisa_____86
14. Relação do número de cães infectados com os respectivos filarídeos (*Dipetalonema reconditum*, *Dirofilaria immitis* e filarídeo da superfamília Filarioidea)_____87
15. Correlação entre a temperatura média diária e o número de cães microfilarêmicos detectados em cada dia da colheita de sangue_____87
16. Relação dos filarídeos encontrados na pesquisa, após realização dos testes parasitológicos e imunológicos, e a quantidade de cães infectados em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense_____90
17. Dados das temperaturas (máxima, mínima e média) obtidos na região de Guaratuba, litoral do Paraná, durante o ano de 1998_____111
18. Dados das temperaturas (máxima, mínima e média) obtidos na região de Guaratuba, litoral do Paraná, durante o ano de 1999_____112

RESUMO

PREVALÊNCIA DE FILARIOSES EM CÃES DO LITORAL PARANAENSE, PARANÁ, BRASIL: DESTAQUE PARA A *Dirofilaria immitis*

A dirofilariose é uma doença cosmopolita, presente notadamente nas regiões costeiras. O agente etiológico, *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) tem como hospedeiro definitivo o cão e canídeos selvagens, apresentando como intermediário os mosquitos da família Culicidae. No Brasil, mais especificamente na costa litorânea dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, a dirofilariose atinge até 45% dos cães. No estado do Paraná não há dados oficialmente registrados com relação à doença. Portanto, o presente trabalho tem a finalidade de determinar a prevalência da dirofilariose no litoral paranaense. Uma vez determinada, médicos veterinários e a população estariam cientes da prevalência da doença para tomar as medidas necessárias de controle e de tratamento. A presente pesquisa envolveu onze regiões do litoral, estrategicamente selecionadas para abranger toda a extensão da costa paranaense. As regiões incluem: Guaraqueçaba, Ilha das Peças, Ilha do Mel, Antonina, Morretes, Pontal do Sul, Ipanema, Shangrilá, Praia de Leste, Matinhos e Guaratuba. Destas, foram selecionados 256 cães, todos maiores de um ano de idade. As amostras sanguíneas obtidas dos cães foram submetidas às seguintes metodologias: exame direto, teste de Knott modificado Newton e Wright (1956) e teste de filtração, para detectar e diferenciar as microfilárias sanguíneas, e testes imunológicos para detectar antígenos de dirofilária no sangue. Por meio destes exames, verificou-se que microfilárias de *D. immitis* e de *Dipetalonema reconditum* estavam presentes. Além destas, o exame parasitológico do sangue detectou uma microfilária que diferiu das duas anteriores, sugerindo a hipótese da existência de um terceiro filarídeo parasito dos cães do litoral paranaense. O exame direto detectou 31 animais (12,11%) com microfilárias no sangue e o teste de Knott detectou 71 animais (27,73%) microfilarêmicos. O teste de filtração foi o mais eficaz em detectar microfilárias no sangue, pois 80 animais (31,25%) apresentaram microfilárias por este método. Os testes imunológicos foram os mais eficazes em diagnosticar animais portadores de dirofilária, uma vez que detectaram 14 animais com presença de antígeno de *D. immitis* no sangue. O teste Knott modificado detectou nove cães com microfilárias de *D. immitis* no sangue e o teste de filtração detectou dez animais. Com relação à endemicidade das regiões, Ilha das Peças e Guaraqueçaba apresentaram alta porcentagem de cães com antígeno de *D. immitis* no sangue (15 e 20% respectivamente). Isto ocorre, provavelmente, em função das características ambientais diferenciadas destas regiões com relação às outras localidades. De uma forma geral, a costa litorânea do estado do Paraná apresenta 5,47% de cães infectados por *D. immitis* (dentre eles, 28,57% têm a infecção na forma oculta) 22,65% de cães infectados por *Dipetalonema reconditum* e 4,68% de animais que apresentaram microfilárias de um terceiro parasito da superfamília Filarioidea. Conclui-se que a dirofilariose está presente no litoral do Paraná e que este apresenta condições ambientais satisfatórias tanto para a permanência quanto para a disseminação da doença. Além disso, a *D. immitis* mantém relações simpátricas com outros dois filarídeos. Desta forma, o diagnóstico deve ser realizado por meio dos testes imunológicos e a presença de microfilárias pelos testes Knott modificado e filtração.

ABSTRACT

PREVALENCE OF FILARIOSIS IN DOGS TO THE BEACH COAST OF PARANÁ STATE – BRAZIL: PROEMINENCE FOR *Dirofilaria immitis*

Heartworm disease, or dirofilariasis, is a worldwide disease, present particularly in beach coasts of the globe. The etiologic agent *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) has as definite hosts dogs and wild canids and as intermediate hosts, or vectors, mosquitoes from the Culicidae family. In Brazil, specifically in the beach coast of São Paulo and Rio de Janeiro states, dirofilariasis may be present in up to 45% of the dogs. There is no official reports about the prevalence of heartworm disease in the state of Paraná. Therefore, the present research has the main objective of determining the prevalence of heartworm disease in the beach coast of Paraná. Once this data is available, veterinarians and the general population could adopt proper measures of treatment and control of this disease. The research included 11 distinct coast regions covering, strategically, the beach coast of Paraná in its fully extension. These regions included: Guaraqueçaba, Ilha das Peças, Ilha do Mel, Antonina, Morretes, Pontal do Sul, Ipanema, Shangrilá, Praia de Leste, Matinhos and Guaratuba. The total of 256 native dogs were studied, all of them were older than one year of age. Blood samples obtained from these dogs were submitted to direct smear examination, Knott modified by Newton and Wright (1956) and filtration tests in order to detect and differentiate microfilariae as well as immunologic tests in order to detect microfilariae antigens. Using these tests, it was observed that *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* microfilariae were present. Curiously, the whole set of parasitologic blood tests showed a different kind of microfilariae, suggesting the occurrence of a third kind of microfilaria in the state. Direct smear examination revealed 31 microfilaremic dogs (12,11%) and Knott-modified test revealed 71 microfilaremic dogs (27,73%). The filtration test was the most efficient in detecting the presence of microfilariae in the blood since 80 dogs (31,25%) were shown to be microfilaremic with this method. Immunologic tests were the most efficient way of diagnosing the presence of the adult form *Dirofilaria immitis*, since they have detected the presence of adult antigens in 14 dogs. If the Knott modified test was used alone for this purpose, only nine dogs would be diagnosed with heartworm infection and if the filtration test also was used alone only ten dogs would be considered with heartworm infection. The region of Ilha das Peças and Guaraqueçaba showed high endemicity with a high percentage of dogs with antigens of *Dirofilaria immitis* in the blood (15 and 20%, respectively), probably because of particular environmental factors found in these two areas. In general terms, the beach coast of Paraná presents 5,5% of the dogs with heartworm infection (among them 28,57% have occult infection); 22,65% of the dogs with *Dipetalonema reconditum* infection and 4,68% of the dogs presenting microfilariae of a third parasite of the superfamily Filarioidea. The present work concludes that heartworm infection is present in the beach coast of Paraná and that this region presents satisfactory environmental factors for the presence and dissemination of the disease. Additionally, *D. immitis* can co-exist with two other microfilariae in the same region. In this way, the diagnosis of heartworm infection should be made with immunologic tests and the presence of microfilariae should be confirmed with other tests only such as the Knott modified or blood filtration tests.

1 INTRODUÇÃO

A dirofilariose canina, investigada há mais de um século, é uma doença que desperta profundo interesse entre os pesquisadores. O agente etiológico *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), vulgarmente denominado de “verme do coração”, é um nematóide que habita o ventrículo direito e as artérias pulmonares de cães e de outros canídeos. A presença do parasito no interior das artérias incita uma reação que resulta em proliferação de tecido endotelial e de músculo liso, presentes na parede destes vasos. Acredita-se que as reações vasculares na dirofilariose ocorram em resposta aos fatores humorais ou às plaquetas ativadas. As lesões na parede das artérias levam a um quadro de hipertensão pulmonar que, por sua vez, propicia a hipertrofia cardíaca direita (DILLON, 1984). A progressão da doença e a severidade das lesões dependem do número relativo de vermes, da duração da infecção e da intensidade da interação parasito-hospedeiro (CALVERT & RAWLINGS, 1983). A forma de manifestação mais freqüente é a cardiopulmonar mas, inicialmente, o animal pode não apresentar sinais clínicos evidentes de doença cardíaca, até que a infestação se agrave substancialmente (RAWLINGS & CALVERT, 1995; NELSON & COUTO, 1998). Este parasito é transmitido por mosquitos, que ingerem microfilárias ao realizarem o repasto sangüíneo em animais microfilarêmicos. As microfilárias ingeridas tornam-se infectantes no interior do mosquito e são transmitidas a outro indivíduo sadio, na ocasião de um novo repasto. Após seis a sete meses da infecção os parasitos adultos, instalados no interior das artérias pulmonares ou ventrículo direito, realizam a cópula. Como consequência, as fêmeas produzem microfilárias, que são liberadas na corrente sangüínea.

A distribuição da dirofilariose canina está relacionada com a dinâmica dos hospedeiros, com a disponibilidade de vetores e com o clima. A doença ocorre em muitos países, tanto do velho quanto do novo mundo, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (HAYASAKI, 1996). O primeiro caso, relatando a dirofilariose em um cão, foi publicado em outubro de 1847 no "The Western Journal of Medicine and Surgery" pelo Dr. T.C. Osborne. Desde então, doença foi amplamente discutida, porém, somente em 1967 ocorreu o primeiro Simpósio de Dirofilariose, no estado da Geórgia, nos Estados Unidos da América do Norte (EUA) havendo um segundo e um terceiro simpósio realizados em 1969 e em 1971, respectivamente. Uma vez que a doença se propagava intensamente pela costa sudeste dos Estados Unidos, Médicos Veterinários pesquisadores decidiram fundar uma sociedade para disseminar novos conhecimentos e estimular pesquisas na área. Portanto, foi fundada, em março de 1974, a "American Heartworm Society" (AHS), juntamente com o quarto Simpósio de Dirofilariose, realizado no estado do Alabama, EUA (OTTO, 1975a). Atualmente, é grande o número de componentes da sociedade, sendo que a maioria das informações sobre a doença provém destes integrantes, que organizam simpósios a cada três anos.

Para o clínico de pequenos animais, animais selvagens e/ou o parasitologista, dois nematóides filarióides têm importância: a *Dirofilaria immitis* e o *Dipetalonema reconditum*, tendo em vista a grande patogenia da primeira e a alta frequência da segunda, entre os cães das diversas regiões do país (JOINER & JARDINE, 1970; OTTO, 1975c). A infecção por *D. reconditum* não é tão importante do ponto de vista clínico, pois, na maioria das vezes é assintomática. Porém, durante a realização do diagnóstico de dirofilariose, o *D. reconditum* deve receber extrema importância uma

vez que suas microfilárias podem ser confundidas com aquelas de *D. immitis* (NEWTON & WRIGHT, 1956; CALVERT & RAWLINGS, 1983).

Para o clínico de humanos a infecção por *Dirofilaria immitis* também merece destaque pois tem reconhecido potencial zoonótico, aparecendo, no homem, como causa importante de granulomas pulmonares (LEVINE, 1974).

No Brasil, os primeiros relatos sobre a doença datam de 1878 pelo Dr. Silva Araújo, da Faculdade de Medicina da Bahia, que estudou os hospedeiros intermediário e definitivo desta parasitose (PINTO, 1944). Hoje a dirofilariose está presente em muitos estados do Brasil, principalmente nas regiões litorâneas.

O litoral paranaense apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento da dirofilariose, pois dispõe dos protagonistas principais: cães em elevada incidência, mosquitos da família Culicidae, áreas com água parada e temperatura média diária superior a 18° C por vários meses. Estas condições possibilitam a maturação e a sobrevivência das microfilárias no mosquito e favorecem a transmissão das mesmas ao hospedeiro definitivo. Todavia, a distribuição da doença no litoral paranaense é desconhecida e, assim, não se tem idéia da gravidade do quadro. A determinação da prevalência desta parasitose nos cães daquele litoral, bem como do melhor método diagnóstico, alertaria a população e os profissionais veterinários para a introdução de medicamentos preventivos, realização do controle aos hospedeiros intermediários e tratamento dos animais infectados, prevenindo assim, a disseminação da doença.

O presente trabalho está constituído por duas partes principais. Na primeira há uma revisão geral sobre as particularidades da *Dirofilaria immitis* e a infecção em cães, bem como dos métodos diagnósticos, tratamento e prevenção da doença. Na segunda parte consta a metodologia da pesquisa, realizada em nível de campo e laboratorial. Para explicitar as metodologias utilizadas e as regiões envolvidas na pesquisa, os resultados e a discussão foram desmembrados em dois. Por último, estão as conclusões que englobam a pesquisa como um todo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência de dirofilariose nos cães nativos do litoral paranaense, até então desconhecida, bem como determinar o melhor método diagnóstico para esta enfermidade, sob as condições paranaenses.

2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar colheita de sangue nos cães das regiões de Antonina, Morretes, Pontal do Paraná (Pontal do Sul, Ipanema, Shangri-lá e Praia de Leste), Matinhos, Guaratuba, Ilha do Mel, Guaraqueçaba e Ilha das Peças, do litoral paranaense;
- b) Detectar a presença de microfilárias sangüíneas, utilizando exame parasitológico direto e testes que envolvam a concentração de microfilárias (teste de Knott (1939) modificado por Newton e Wright (1956) e de filtração);
- c) Diferenciar as microfilárias sangüíneas encontradas: *Dipetalonema reconditum* e *Dirofilaria immitis*;
- d) Determinar a prevalência de *Dirofilaria immitis*, comprovada por teste imunológico que detecta o antígeno no sangue total, soro ou plasma. Adicionalmente, determinar a ocorrência de *Dipetalonema reconditum*;

- e) Determinar qual a melhor técnica para o diagnóstico de dirofilariose canina, comparando os métodos: exame parasitológico direto; técnica de Knott (1939) modificada por Newton e Wright (1956); técnica por filtração em membrana e teste tipo ELISA para detecção de antígeno.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - GENERALIDADES SOBRE A *Dirofilaria immitis*

Uma vez que a dirofilariose tem importância na medicina veterinária e na medicina humana, este capítulo relata as particularidades sobre a *Dirofilaria immitis*, seus hospedeiros e sobre a doença em decorrência à parasitose.

3.1 Posição taxonômica

Segundo ANDERSON (1992) a *Dirofilaria immitis* pertence:

- Subclasse Secernentea
- Ordem Spirurida
- Subordem Spirurina
- Superfamília Filarioidea
- Família Oncocercidae
- Subfamília Dirofilarinae
- Gênero *Dirofilaria*
- Espécie *D. immitis* (Leidy, 1856)

3.2 Descrição morfológica

Os parasitos adultos da *D. immitis* são vermes longos, brancos e filamentosos. Os machos medem de 12 a 16 cm de comprimento e apresentam a extremidade caudal espiralada. Apresentam uma asa caudal estreita, três pares de

grandes papilas caudais, sendo uma delas pós-anal, e três pares de pequenas papilas próximas da ponta da cauda. Possuem, também, dois espículos, o esquerdo tem 324 a 375 μm de comprimento e o espículo direito tem 190 a 229 μm . As fêmeas são ovovivíparas e medem entre 25 a 30 cm de comprimento. Nestas, a abertura vulvar situa-se imediatamente atrás da terminação do esôfago. As microfilárias têm 218 a 329 μm de comprimento com uma extremidade caudal ponteaguda (OLSEN, 1974).

3.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico da *Dirofilaria immitis* (Figura 1) necessita especialmente de dois hospedeiros: o definitivo vertebrado e o intermediário invertebrado. O parasito adulto, que vive mais de cinco anos, habita principalmente as artérias pulmonares e as câmaras cardíacas direitas de canídeos. Além destes locais, a *D. immitis* tem sido encontrada em locais erráticos como: câmara anterior do olho, ventrículos cerebrais, veia cava, cavidades hepática, torácica e abdominal e sob a forma de granulomas subcutâneos (LEVINE, 1974). As fêmeas adultas, sexualmente maduras, fazem a parição de microfilárias de primeiro estágio larval (L1) que circulam com o sangue por mais de dois anos e meio (GARLICK, 1975). O hospedeiro intermediário, um mosquito da família Culicidae, ingere as microfilárias L1 presentes no sangue do hospedeiro definitivo. Em alguns mosquitos o tipo da armadura proventricular ou a coagulação do sangue no esôfago médio impede que a maioria das microfilárias sobreviva ou saia do esôfago (BRADLEY & NAYAR, 1987). As larvas migram, em

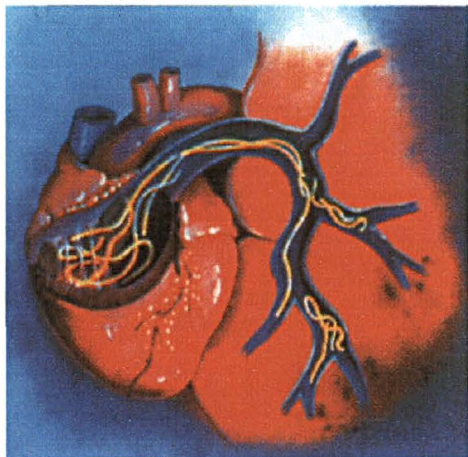
questão de 24 a 36 horas, do intestino do mosquito para os túbulos de Malpighi, onde fazem uma muda para o segundo estágio larval (L2). Após um período de crescimento, a L2 sai da célula tubular hospedeira, onde ocorre a segunda muda para o terceiro estágio infectante. A larva de terceiro estágio (L3), de aproximadamente 900 µm de comprimento, migra pelo tórax do mosquito, em sentido cranial, para atingir o lábio onde permanece até o próximo repasto sangüíneo. O tempo para atingir o estágio larval infectante gira em torno de 10 a 30 dias, pois é extremamente dependente da temperatura ambiental, sendo que em temperaturas de 21° C há um satisfatório desenvolvimento das microfilárias (TAYLOR, 1960). Quando o mosquito realiza novo repasto a larva L3 infectante, alojada no lábio, passa para a pele do hospedeiro definitivo. A larva penetra no orifício da picada, nos folículos pilosos ou penetra na pele íntegra e passa a percorrer o tecido subcutâneo do novo hospedeiro. Enquanto está no tecido subcutâneo ou nos tecidos adjacentes, a L3 faz a terceira muda para o estágio larval L4, que ocorre entre o nono e o décimo segundo dia após a entrada. Nos tecidos do hospedeiro definitivo a L4 cresce até 25 cm e, após sessenta a setenta dias da entrada, sofre a última muda para o estágio L5 (OLSEN, 1974). Os parasitos jovens (L5) entram nos vasos sangüíneos em aproximadamente cem dias após a infecção, migrando notadamente para as artérias pulmonares periféricas dos lobos pulmonares caudais (NELSON & COUTO, 1998). O desenvolvimento até a maturidade leva ao todo 174 a 223 dias, quando novas microfilárias (L1) aparecem na corrente sangüínea. O período reprodutivo pode perdurar cinco anos (OLSEN, 1974). Em suma, passam-se cerca de seis a sete meses da entrada do parasito no hospedeiro até que ele se instale no ventrículo direito e/ou artérias pulmonares. Posteriormente,

a infecção torna-se patente com as fêmeas grávidas liberando microfilárias. Portanto, filhotes de cão com menos de seis meses de idade apresentando microfilárias circulantes, não têm a doença na fase patente, pois, provavelmente, as tenha recebido pela via transplacentária (MANTOVANI, 1966; TODD & HOWLAND, 1983; NELSON & COUTO, 1998). Entretanto, não foi demonstrado que L3 e L5 possam cruzar a barreira placentária, só se sabe que a presença de microfilárias em filhotes é possível, no entanto, é rara (CALVERT & RAWLINGS, 1983).

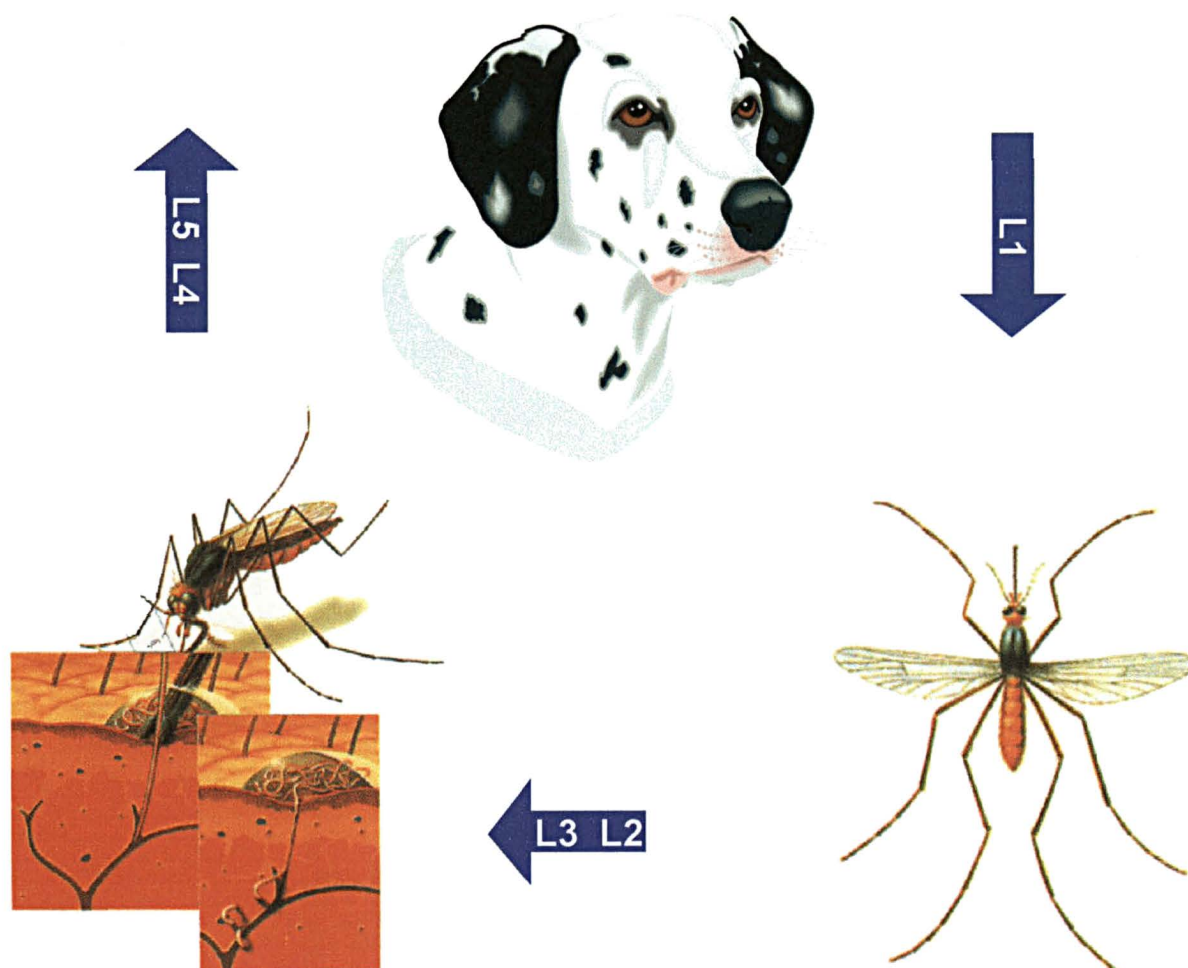
3.4 Hospedeiros acidentais

Além da importância patológica e parasitológica que o grupo de filarióides possui, vários de seus membros podem acometer diferentes espécies de animais, tais como a canina e a felina, além de várias espécies selvagens (KNIGHT, 1995). No caso da *Dirofilaria immitis*, há relatos de ocorrências em lobos, coiotes, raposas, diversos felinos (incluindo o gato doméstico), leões marinhos, focas, mustelídeos (ex. furões), ursos, pandas, castores, quatis, coelhos, cervos, cavalos, primatas não humanos e humanos entre outros (OTTO, 1975c; ANDERSON, 1992). A maioria destas infecções foram esporádicas e poucos animais exibiram microfilaremia. Entretanto, nos coelhos, HAYASAKI (1996) estudou a re-migração das larvas juvenis de quinto estágio e sugeriu a possibilidade de ocorrer o desenvolvimento da dirofilariose nestes animais.

Após 6 a 7 meses da infecção, dirofilárias adultas no ventrículo direito e nas artérias pulmonares medem entre 15 e 30 centímetros.



Microfilárias de estágio L1 na corrente sanguínea. Estas microfilárias são liberadas por fêmeas adultas.



Após 14 dias ou mais, as microfilárias L1 fazem muda para L2 e para L3. Durante o repasto sanguíneo do mosquito as larvas L3 são depositadas na superfície da pele. Estas L3 penetrarão nos tecidos subcutâneos do hospedeiro.

Mosquitos vetores da *Dirofilaria immitis* (Aedes, Culex, etc), ingerem as microfilárias L1.

FIGURA 1 - Ciclo biológico da *Dirofilaria Immitis*.
fonte: Rhodia-Mériux

A infecção por *Dirofilaria immitis* tem reconhecido potencial zoonótico digno de registro, aparecendo, no homem, como causa importante de granulomas pulmonares (LEVINE, 1974). Os fatores de risco para os humanos não estão claramente definidos, porém, dependendo da localização do parasito, podem ocorrer três manifestações clínicas já conhecidas: a forma intravascular, a pulmonar e a forma cutânea. Na dirofilariose intravascular o parasito aloja-se nas câmaras cardíacas ou nos grandes vasos. Quando em uma artéria pulmonar produz uma região de infarto cercada por pneumonia eosinofílica. A radiografia pulmonar revela uma lesão que fora denominada lesão em moeda (*coin lesion*) que pode ser confundida com neoplasia; portanto, a biópsia ou excisão cirúrgica, seguidas de exame histopatológico, são necessárias para o diagnóstico desta enfermidade (FELDMAN & HOLDEN, 1974; WRIGHT; HENDRIX & BROWN, 1989). A utilização de testes diagnósticos, para dirofilariose humana, como hemoaglutinação indireta e ELISA não foi eficaz, pois houve grande quantidade de reações cruzadas com outros parasitos e resultados falso negativos (WRIGHT; HENDRIX & BROWN, 1989). Grande parte dos casos humanos confirmados é assintomático, entretanto, os sintomas consistem em tosse e dor no peito ocasionais, hemoptise, mal estar, mialgia e febre. A lesão em moeda observada no homem ocorre como um nódulo pulmonar simples, com aspecto microscópico uniforme, cercado por focos de necrose de coagulação e envolto por uma faixa de tecido fibroso. Em um caso de dirofilariose humana, a remissão dos sintomas foi observada após o tratamento com citrato de dietilcarbamazina (FELDMAN & HOLDEN, 1974). Nestes casos de dirofilariose humana detecta-se somente um único parasito que nunca desenvolve-se até a maturidade sexual, conseqüentemente, nunca foi detectado microfíliarias no sangue periférico do

homem. No Brasil, o primeiro caso autóctono de dirofilariose humana foi relatado em 1896 por Blanchard, que constatou a presença de um verme adulto no coração (OTTO, 1975c).

3.5 Epidemiologia

A dirofilariose tem distribuição cosmopolita e os focos desta doença parecem estar ligados às maiores concentrações urbanas, onde existe grande população canina e abundância de mosquitos com alto potencial de transmissibilidade. Porém, o acentuado movimento de cães microfilarêmicos por meio de viagens com seus proprietários e a crescente urbanização podem promover a propagação da filariose canina nas zonas livres de dirofilariose. Nestes casos o parasito pode facilmente se estabelecer, surgindo novos focos (WALTERS, 1995).

A epidemiologia da dirofilariose em cães é discutida frente aos seguintes fatores de risco: 1) tipo de região, 2) grau de devastamento, 3) *status* econômico da população, 4) densidade e demografia canina, 6) densidade e periodicidade de microfilárias em cães infectados, 7) potencial dos mosquitos vetores e 8) associação ecológica com canídeos selvagens (WALTERS, 1995). As taxas de prevalência de filárias são as mais variáveis, mesmo dentro de uma mesma região, todavia, são maiores nas áreas litorâneas tropicais ou subtropicais, devido à grande concentração de mosquitos. Não se deve excluir as áreas longínquas da costa, onde a doença também se apresenta como um problema. O maior risco de dirofilariose aparece em áreas geobotânicas devastadas, com alta densidade de cães e, principalmente, onde há uma proporção grande de cães alojados no peridomicílio,

com fêmeas ou machos castrados e residentes no local por mais de cinco anos. A densidade de cães influencia diretamente no grau de contato mosquito-cão-mosquito e na transmissão do parasito para os animais domésticos. Quanto maior a densidade canina, maiores são as chances de um mosquito infectado encontrar um hospedeiro susceptível. Com relação aos fatores econômicos e os educacionais, ambos podem influenciar na disseminação da doença da seguinte forma: desconhecimento da dirofilariose como sendo uma doença de cães; falta de cuidado médico veterinário, baixo poder aquisitivo ou desinteresse em testar/tratar os cães para dirofilariose, não utilização de métodos profiláticos e desinteresse em cooperar nas pesquisas de prevalência (WALTERS, 1995). Os canídeos selvagens podem contribuir para a disseminação da dirofilariose, notadamente, nas regiões com baixa densidade de cães e vetores com baixa capacidade de dispersão. WALTERS (1995) reportou que os cães residentes há mais de cinco anos na região têm um risco 12,2 vezes maior de infectarem-se que os residentes há menos de um ano. Em relação à exposição aos mosquitos, os cães alojados estritamente fora de casa têm um risco de se infectar 5,4 vezes maior comparado com aqueles mantidos parte do dia dentro de casa. O risco também aumenta para fêmeas castradas (4,2 vezes) e cães machos (3,0 vezes) quando comparado a fêmeas intactas. Estas últimas teriam maior resistência devido à presença de estrógeno, que pode retardar o desenvolvimento e a reprodução do parasito. Os cães que vivem estritamente fora de casa estão expostos às picadas dos mosquitos por 24 horas, no entanto, aqueles cães mantidos parte do dia dentro de casa podem ter um risco variado de infecção, dependendo dos hábitos alimentares dos vetores. No entanto, há cães mantidos dentro de casa que adquirem dirofilariose, sugerindo uma transmissão domiciliar ou

peridomiciliar. A raça não é considerada um fator de risco independente, apenas está influenciada pelo o estilo de vida associado à exposição (WALTERS, 1995).

Nos Estados Unidos da América do Norte, a “American Heartworm Society” tem se destinado, intensamente, ao estudo da dirofilariose desde 1974. Desta forma, há grande disponibilidade de dados epidemiológicos nesse país, demonstrando que o parasito circula tanto nas regiões costeiras como em regiões mais afastadas do litoral. A dirofilariose tem sido enzoótica, nos Estados Unidos, por mais de meio século apenas nas regiões litorâneas do sudeste, porém, na década de 60 a doença foi detectada, com frequência significativa, nos estados longínquos da costa e nos estados do meio oeste (OTTO, 1975b). As prevalências mais altas no meio oeste foram encontradas nos vales dos grandes rios e lagos, incluindo Illinois, Indiana e sudeste de Michigan, além de Minnesota e Wisconsin. Com menor incidência estavam: Texas, Oklahoma, Kansas e Nebraska. Foram, também, detectados casos no norte da Califórnia, em Denver e no sudeste do Canadá (CALVERT & RAWLINGS, 1983). Na década de 30 BROWN (1937) relatou a prevalência de 80% de *D. immitis* em cães do estado da Georgia, EUA. WARD & FRANKLIN (1953) observaram 30% de dirofilariose no estado de Mississippi, EUA, contudo, NEWTON & WRIGHT (1956) alertam que os dados de prevalência anteriores à 1956 fundamentaram-se, apenas, na existência de um único parasito. Estes autores foram os primeiros a alertar da existência de outro filarídeo, o *Dipetalonema reconditum*. Este último demonstrava microfilárias na corrente sangüínea, muito semelhantes às de *D. immitis*, mas caracterizava-se pelo fato do adulto habitar os tecidos subcutâneos do hospedeiro definitivo. Após quatro anos de pesquisa no centro sul de Nova Jersey, verificou-se a prevalência de dirofilariose em cães e gatos de 9,3% e 0,95% respectivamente,

agora respeitando a diferenciação dos filarídeos (LILLIS, 1964). Interessante citar que, pesquisas no estado de Minnesota, EUA, detectaram o primeiro caso de dirofilariose em 1937 e em 1960 foi detectado 85,95% da doença na cidade de Mineápolis, capital do estado. Nesta região, medidas de controle foram tomadas a partir da década de 60 e, em 1992, a incidência de dirofilariose baixou para 0,35% (STROMBERG; PROUTY; AVERBECK *et al.*, 1995).

Na América Central, os dados epidemiológicos são muito limitados. Nas ilhas do Caribe a *D. immitis* e *D. reconditum* são enzoóticos, no entanto a prevalência de cada filária varia amplamente de ilha para ilha. Em Cuba a incidência de dirofilariose relatada em Havana atinge 7 a 19% e na Ilha da Juventude atinge 37 a 63%. Em Curaçao verificou-se valores de 9 a 11% e nas Bahamas, 53%. A presença de dirofilariose em Porto Rico variou de 3,1 a 20,4%, sendo que havia prevalência de 1,6 a 6,2% para o *D. reconditum* (KOZEK; VAZQUEZ; GONZALEZ *et al.*, 1995).

Na Europa, a Espanha apresentava prevalência relativamente elevada de dirofilariose nos anos 80 e, em 1989, foi instituído o uso de programas de prevenção em regiões onde a infecção foi relatada como significativa. Entretanto, no estado de Cataluña, que apresentava 0,38% de dirofilariose, a prevenção não foi realizada e, em novo relato da prevalência em 1990, constatou-se que 15/694 (2,17%) dos cães examinados apresentaram microfilaremia por *D. immitis* e 36/694 (5,3%) dos cães apresentaram antígenos circulantes de *D. immitis* por meio do teste VetRed. Isto indica que a prevalência de dirofilariose na Cataluña aumentou consideravelmente desde 1989 (GUERRERO; RODENAS; GUTIERREZ *et al.*, 1995). Na Itália, dados epidemiológicos mostram que, mesmo assumindo não haver diferenças de temperatura entre duas regiões, há uma inversão dos padrões de distribuição de

D. immitis e de *D. repens* nos cães (GENCHI; BASANO; BANDI *et al.*, 1995). Após estudos laboratoriais, foi comprovado que há um certo grau de imunidade específica nos cães, após a primeira infecção com uma dada espécie de *Dirofilaria* sp. Os pesquisadores concluíram que o estabelecimento da infecção por *D. immitis* sobrepondo-se a uma infecção por *D. repens* já existente é mais difícil de ocorrer do que uma infecção por *D. repens* em um hospedeiro apresentando infecção prévia por *D. immitis*. Além disso, repetidas infecções laboratoriais, com trinta dias de intervalo, utilizando-se a mesma espécie de parasito, afetam o desenvolvimento de adultos de ambas as espécies. Isto determina o parasito e a carga parasitária que se estabelecerão no hospedeiro, influenciando nos padrões de prevalência (GENCHI; BASANO; BANDI *et al.*, 1995).

Em se tratando de Brasil, em 1878 a dirofilariose foi estudada pela primeira vez na Faculdade de Medicina da Bahia. Em 1936 foi relatada a presença de *D. immitis* na vesícula biliar de um cão do Rio de Janeiro e em 1943 detectou-se 16% de dirofilariose entre 300 cães estudados na cidade de Belém, Pará (PINTO, 1944). Em vários estados do Brasil a dirofilariose tem sido assinalada, estendendo-se deste o Pará até o Rio Grande do Sul. Os estados de São Paulo e Rio de Janeiro apresentaram índices alarmantes de aproximadamente 40% de dirofilariose nas regiões litorâneas (NASCIMENTO E WERMELINGER, 1971; LABARTHE, 1997; LABARTHE; ALMOSNY; GUERRERO *et al.*, 1997).

Os dados sobre a biocenose *D. immitis*-mosquito-cão nas regiões paranaenses são desconhecidos. Apenas, há uma pesquisa realizada em 1972, por alunos da disciplina de Clínica Médica de Pequenos Animais da Universidade Federal do Paraná. Nesta pesquisa, detectaram a prevalência de 80% de microfilárias de *D. immitis*, entre 87 cães nativos de Guaraqueçaba, região litorânea

do Paraná. Estas são observações feitas por KAVINSKI, L.C. (1999, Comunicação pessoal). No entanto, esta pesquisa pioneira não diferenciou as microfilárias daquelas de *D. reconditum* e apenas dois casos de dirofilariose foram confirmados por meio da realização de necropsia e um por cirurgia.

Com relação à epidemiologia da dirofilariose felina, curiosamente, o primeiro relato de dirofilariose em gatos foi descrito no Brasil, em 1921, por TRAVASSOS (1921) *appud* RYAN & NEWCOMB (1995). Este marco inicial invalida o relato de NUNES (1989) que alegou o seu achado como sendo o primeiro na América do Sul. Sabe-se que a prevalência desta doença em gatos aparece de forma paralela à de cães dentro da mesma região, no entanto, as taxas de infecção são geralmente mais baixas nos gatos, atingindo 5 a 20% daquela observada em cães (CORNEILL & ABID, 1988; RYAN & NEWCOMB, 1995). Além dos Estados Unidos, a dirofilariose felina está presente na Itália, Japão, Canadá, Austrália e Brasil. Também há relatos da existência na França, Armênia, Venezuela, Filipinas, Malásia, Nova Guiné, Taiti, Sierra Leone e China (RYAN & NEWCOMB, 1995). Em áreas onde a taxa de infecção felina é alta, tal fato pode ser elucidado pela presença de: 1) mosquitos vetores com maior preferência por gatos, 2) poucos cães infectados e grande população felina, 3) população de gatos mais suscetível à infecção ou 4) felinos servindo como reservatório da infecção. Dos gatos infectados naturalmente, menos de 20% apresentam microfilaremia, mas os mosquitos que se alimentam de felinos com microfilárias no sangue podem transmitir a doença para outros animais, portanto, aquele animal é um reservatório da infecção. Os gatos não são considerados hospedeiros normais para o verme do coração, porém esta doença é bastante severa e responsável por alta mortalidade nestes animais, mesmo quando

infectados por apenas dois parasitos adultos (McCALL; CALVERT & RAWLINGS, 1994).

3.6 Periodicidade das microfilárias sangüíneas

A periodicidade das microfilárias está relacionada às alterações na densidade de microfilárias na circulação periférica do cão de acordo com o período do dia. O comportamento desta periodicidade tem sido descrito, convencionalmente, como aperiódico, subperiódico ou periódico. A forma aperiódica mostra uma alteração mínima na densidade periférica durante as 24 horas do dia. Na forma subperiódica, apesar da permanência contínua das microfilárias na corrente sangüínea, há períodos em que exibe densidade mais alta ou mais baixa. A forma periódica exibe um padrão de alternância entre densidades rara/ausente ou alta de microfilárias na circulação. A maior densidade de microfilárias na circulação pode aparecer tanto no período diurno quanto no noturno, representando uma evolução na adaptação destes parasitos para maximizar a ingestão pelos mosquitos. As microfilárias utilizam o ritmo fisiológico circadiano do hospedeiro como tática para permanecer na circulação sangüínea, um local ecologicamente favorável para a sobrevivência. Quando não em circulação, as microfilárias são seqüestradas para os pequenos vasos dos pulmões, local fisiologicamente favorável para a sobrevivência. O estilo de vida individual dos cães pode afetar a força destas táticas fisiológicas que as microfilárias utilizam e também afeta a periodicidade na corrente sangüínea (WALTERS, 1995).

Em São Paulo, LARSSON; MENG; RECHE JÚNIOR *et al.* (1995) estudaram a variação da microfilaremia em cães infestados por *D. immitis*. Afirmaram que as

microfilárias podem ser encontradas no sangue periférico durante todo o dia. Também observaram picos de contagem ora noturnos, ora diurnos, mas em nenhuma ocasião as microfilárias deixaram de ser detectadas no período de observação de 24 horas. Em outro estudo sobre a periodicidade das microfilárias de *D. reconditum*, em cães capturados no município de Belo Horizonte, constatou-se que embora havendo uma tendência para as microfilárias ocorrerem em maior número às 9, 15 e 21 horas, não há alteração definida da periodicidade (LIMA & COSTA, 1972).

Flutuações sazonais na densidade de microfilárias podem ocorrer em cães sendo que as densidades mais altas foram observadas no verão (SAWYER, 1975a). Mas ainda não há estudos suficientes da periodicidade e da densidade de microfilárias em cães, com base nas diversas estações do ano (WALTERS, 1995). A significância do achado de baixas densidades de microfilárias com subperiodicidade nos cães é que, nestas condições, a proporção de mosquitos infectados que sobreviverão durante a incubação extrínseca pode ser maior quando comparado com densidades maiores de microfilárias.

3.7 Mosquitos vetores

O primeiro relato demonstrando que os mosquitos da família Culicidae (Diptera) são os hospedeiros intermediários para a *D. immitis* foi realizado por GRASSI & NOÉ (1900) *appud* LUDLAM; JACHOWSKI & OTTO (1970). Nesta época, também suspeitava-se da possibilidade de outros artrópodos estarem envolvidos como hospedeiros intermediários.

Os principais fatores que determinam a existência e permanência dos potenciais mosquitos vetores em uma dada região incluem: 1) prevalência relativa e atividade sazonal; 2) comportamento alimentar em cães (diurno, noturno); 3) ciclos de repasto sangüíneo; 4) capacidade biológica do desenvolvimento da *D. immitis*; 5) sobrevivência dos mosquitos infectados e 6) capacidade de dispersão (WALTERS, 1995).

Demonstrou-se que mais de sessenta espécies de mosquitos são capazes de transmitir a *D. immitis* sob condições experimentais ou naturais (LUDLAM; JACHOWSKI & OTTO, 1970). YEN (1938) sugeriu vários vetores potenciais em seu estudo com mosquitos no estado de Minnesota, EUA, mas não se ateve a estudos de campo. Contudo, BEMRICK & SANDHOLM (1966) relataram que o *Aedes vexans* foi o melhor vetor para a *D. immitis* na região norte dos Estados Unidos (estado de Minnesota). Também observaram um desenvolvimento completo da *D. immitis* no *Anopheles walkeri*, provando que poderia ser um vetor potencial.

No Brasil há poucos estudos com os vetores da dirofilária, sendo que as espécies mais freqüentemente capturadas na cidade do Rio de Janeiro, em ordem decrescente foram: *Aedes taeniorhynchus*; *Culex quinquefasciatus*; *Aedes scapularis*; *Culex declarator*; *Culex nigripalpus*; *Aedes albopictus* e *Wyenomyia bourrouli* (LABARTHE; SERRÃO; MELO *et al.*, 1998a). Contudo, para serem vetores potenciais da *D. immitis* os mosquitos devem viver tempo suficiente para permitir o completo desenvolvimento da larva. Além disso, as espécies com maior alcance de vôo e que procuram seus hospedeiros são melhores vetores (LUDLAM; JACHOWSKI & OTTO, 1970). Neste caso o *Aedes scapularis* seguido pelo *Aedes taeniorhynchus* e *Culex quinquefasciatus*, preenchem completamente os requisitos de vetor da *D.*

immitis em Itacotiara, região oceânica de Niterói, RJ. Entretanto, *Culex declarator* e *Wyenomyia bourrouli* não demonstraram larvas infectantes e nunca foram descritos como vetores potenciais (LABARTHE; SERRÃO; MELO *et al.*, 1998b). Considerando a frequência mensal durante o ano, o *Aedes taeniorhynchus* apareceu somente entre os meses de abril e junho, o *Aedes scapularis* mostrou maior densidade entre agosto e janeiro e o *Culex quinquefasciatus*, perfazendo 25% dos mosquitos capturados, estava presente durante todo o ano (LABARTHE; SERRÃO; MELO *et al.*, 1998a). Em Itacotiara, RJ, o *Aedes scapularis* mostrou uma capacidade maior em suportar a infecção por *D. immitis* em comparação com o *Aedes aegypti*, pois limitou o desenvolvimento das larvas que o torna um vetor para a dirofilariose (MACÊDO; LABARTHE; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Os trabalhos publicados sobre a fauna de mosquitos e os verdadeiros vetores da dirofilariose na Floresta Atlântica estão restritos aos estados Rio de Janeiro e São Paulo. Com relação ao Paraná os dados são mais escassos e ainda não há estudos sobre os possíveis vetores potenciais da dirofilariose neste estado. As espécies: *Aedes (Ochlerotatus) scapularis*, *Culex (Culex) grupo coronator*, *Culex (Culex) quinquefasciatus* e *Aedes (Ochlerotatus) crinifer* perfizeram mais de 10% das espécies capturadas em uma certa área preservada de Curitiba, Pr. A espécie mais freqüente foi *Culex coronator* (SILVA & LOZOVEI, 1998). Em Morretes, região litorânea do Paraná, foram capturadas diversos exemplares de mosquitos. Dentre eles, os grupos mais abundantes compreenderam: *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, *Culex (Culex) spp.*, *Culex (Melanoconion) spp.*, *Culex (Melanoconion) ribeirensis*. Além disso, este mesmo autor verificou que a população de *Anopheles cruzii* e a de *Culex ribeirensis* têm maior atividade noturna. A temperatura noturna dos meses de

dezembro e janeiro, que ficou em 20° C ou mais, favoreceu a atividade de *C. ribeirensis*. Com relação à sazonalidade, o *A. cruzii* tem maior ocorrência no fim do verão e início do outono. O *C. ribeirensis* apresenta pico no fim da primavera (SANTOS NETO, 1997).

A taxa de sobrevivência dos mosquitos ingurgitados no período da incubação extrínseca, a proporção de mosquitos que subsequente tornam-se infectivos com larvas de terceiro estágio na cabeça e lábio e o número de L3 produzidas são variáveis biológicas importantes em influenciar a capacidade do vetor. Em geral, a sobrevivência dos mosquitos ingurgitados está inversamente relacionada à sua carga parasitária. Todas as espécies mostraram dependência à mesma temperatura média para a incubação extrínseca. As espécies de *Anopheles* apresentam a menor sobrevivência durante o período de incubação seguido pelas espécies de *Aedes*, por outro lado, as espécies de *Culex* sobrevivem por mais tempo. Um estudo no norte do estado da Califórnia, EUA, analisou o período de incubação extrínseca em muitas espécies de *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. Neste estudo, constatou-se um aumento de 1,3 dias no período de incubação, para cada grau Celsius diminuído da temperatura média (WALTERS, 1995). A taxa de muda para o segundo e terceiro estágios parece estar melhor relacionada com temperaturas entre 18 a 30° C (KNIGHT & LOK, 1995). O estágio infectante pode ser atingido em apenas oito dias à temperatura constante de 30° C ou pode levar 29 dias em 18° C. No entanto, a larva infectante não foi encontrada nas peças bucais dos mosquitos quando a temperatura estava inferior a 18° C. Um fato curioso foi a demonstração de que as microfilárias L1 de *D. immitis* eram capazes de se desenvolver no mosquito após serem expostas à temperatura de 68° C negativos, em sangue heparinizado (BEMRICK; BUCHILI & GRIFFITHS,

1965). Fatores ambientais como temperatura, umidade e presença de monoculturas extensivas estão correlacionados com a densidade de mosquitos e a prevalência da infecção nos hospedeiros. Um grande número de cães microfilarêmicos é necessário para a manutenção da infecção, mas a densidade de mosquitos é o fator mais importante em determinar a incidência de dirofilariose (GENCHI; BASANO; BANDI *et al.*, 1995).

A *D. immitis* é um parasito nocivo para os cães e suas larvas também lesam os hospedeiros intermediários. Assim sendo, a densidade de microfilárias no sangue periférico do hospedeiro definitivo pode afetar diretamente os mosquitos vetores. Uma alta concentração de microfilárias ingeridas pelo mosquito geralmente reduz sua sobrevivência, pois as mesmas lesam as células dos túbulos de Malpighi (YEN, 1938; WALTERS, 1995). As larvas L1, ingeridas pelos mosquitos, tornam-se mais curtas, uma conformação ótima para a vida sedentária que elas levam, permanecem por 24 horas no estômago e, nas próximas 24 horas, migram para penetrar nos túbulos de Malpighi (TAYLOR, 1960). O processo de migração das larvas parece ser favorecido por anticoagulantes, produzidos por certos mosquitos. O *Anopheles quadrimaculatus* morre antes das microfilárias se desenvolverem até L3 e isto ocorre, em parte, porque ele produz um anticoagulante que permite a máxima penetração das mesmas nos túbulos de Malpighi. Porém, no *Culex quinquefasciatus*, que não produz anticoagulante, ocorre a coagulação do sangue ingerido dificultando a penetração das microfilárias para o túbulo de Malpighi. Assim, poucas microfilárias são encontradas no *C. quinquefasciatus*, que é um vetor potencial, pelo simples fato de possuir baixa mortalidade quando infectado por microfilárias (CORWIN, 1983). A coagulação do sangue ingerido pelos mosquitos comprova que os mesmos

apresentam barreiras intrínsecas para o desenvolvimento da *D. immitis*. Dentre as barreiras, há a lesão larvária, devido ao tipo da armadura do cibário das fêmeas dos mosquitos; presença de cristais de oxihemoglobina, formados pela coagulação do sangue ingerido; lise da cutícula larvária, por células do hospedeiro e outras respostas imunes como a encapsulação e/ou melanização do parasito nos túbulos de Malpighi. Todos estes fatores fazem com que o número de larvas que alcançarão a maturidade seja bem menor que o número de larvas ingeridas (YEN, 1938). Nas espécies que servem como bons vetores para a *D. immitis*, as microfilárias L1 migram para o lume do túbulo de Malpighi e penetram nas células primárias da porção distal do túbulo, onde sofrem duas mudas em 10 a 30 dias (TAYLOR, 1960; BRADLEY; SAUERMAN & NAYAR, 1984). Em 48 horas da infecção, as células parasitadas dos túbulos de Malpighi, no *Aedes taeniorhynchus*, exibem alterações da estrutura dos microvilos e retração das mitocôndrias para longe das microvilosidades (BRADLEY; SAUERMAN & NAYAR, 1984). Apesar destas alterações patológicas nos túbulos de Malpighi, a maioria das fêmeas de *A. taeniorhynchus* infectadas sobrevivem e podem transmitir os parasitos (NAYAR & SAUERMAN, 1975 *appud* BRADLEY & NAYAR, 1987). Entretanto, nos últimos 13 ou 15 dias, quando a larva infectante emerge dos túbulos, rupturando-os, há alta mortalidade nos mosquitos das espécies de *Anopheles*, diferentemente do que foi observado nos *Aedes*, que podem sobreviver à emergência das larvas (BRADLEY & NAYAR, 1987). YEN (1938) ao estudar os vetores da *D. immitis*, observou a formação de uma cápsula pigmentada ao redor das larvas, como reação do hospedeiro ao parasito. Esta estrutura já havia sido detectada em 1900, por outros pesquisadores. A encapsulação ou melanização de parasitos metazoários em vários dípteros era

considerada como uma resposta humoral, envolvendo componentes da hemolinfa (CHRISTENSEN & FORTON, 1986). Entretanto, havia resposta humoral e celular. Pois os parasitos e outros objetos estranhos, quando grandes para serem fagocitados, eram melanizados e encapsulados por numerosas células sangüíneas. Estas células ou hemócitos aderiam-se umas às outras e à superfície do corpo estranho, formando uma cápsula multicelular (NAPPI & CHRISTENSEN, 1986). Esta formação capsular ocorria após o reconhecimento do parasito e a ativação dos hemócitos, que passavam a sintetizar melanina. Posteriormente, ocorria a lise dos hemócitos ou a liberação de melanina por exocitose, próxima ou diretamente na superfície do parasito, formando uma cápsula de melanina. Há, ainda, uma segunda camada, composta por fragmentos das células lisadas, que isola a cápsula de melanina dos componentes da hemolinfa (CHRISTENSEN & FORTON, 1986). Assim, vários pesquisadores mostraram que havia uma resposta mediada por células na melanização de microfilárias de *D. immitis* inoculadas intratoracicamente, observada no *Aedes trivittatus* e no *A. aegypti* por FORTON; CHRISTENSEN & SUTHERLAND (1985); CHRISTENSEN & FORTON (1986); NAPPI & CHRISTENSEN (1986).

3.8 Fisiopatologia e sinais clínicos

A *Dirofilaria immitis* tem a capacidade de lesar muitos órgãos e aparelhos de cães e gatos, deixando como principal seqüela uma doença cardiopulmonar. Quando em pequeno número, os parasitos adultos instalam-se nas artérias pulmonares dos lobos caudais e acessório, como principais sítios de eleição, mas assim que o número de parasitos atinge aproximadamente 25 em um cão de 25 kg,

alguns migram para o ventrículo direito. Já, a presença no átrio direito e na veia cava caudal tem sido associada a um número superior que cinquenta vermes (CALVERT & RAWLINGS, 1983). Um número excessivo de vermes também pode gerar uma interferência mecânica do fluxo cardíaco em seu trato direito, valva tricúspide, veia cava ou artérias pulmonares. As reações do hospedeiro em resposta à presença da *D. immitis* são mais importantes em afetar o sistema cardiovascular que a simples presença dos parasitos. Tais reações não mantêm relação com o número de parasitos, mesmo porque poucos deles já são suficientes para causar grave lesão pulmonar (NELSON & COUTO, 1998).

A dirofilariose pode apresentar-se de forma aguda, mas normalmente tem seu início insidioso, resultante de uma infecção crônica. A maioria dos cães com dirofilariose não demonstra sinais clínicos. Entre os que são sintomáticos, há maior evidência do envolvimento cardiovascular, pois demonstram fadiga, dispnéia e tosse, como manifestações clínicas mais freqüentes (LARSSON; IWASAKI; LARSSON *et al.*, 1988). Alguns cães apresentam perda de peso, respiração curta, síncope ou sinais de insuficiência cardíaca congestiva direita. A perda ou disfonia do latido tem sido relatado em cães (NELSON & COUTO, 1998). Ocasionalmente, há migração errática dos parasitos para os membros, olhos, cérebro e outros sítios, causando sinais clínicos associados ao local, como por exemplo alterações neurológicas e uveíte (LEVINE, 1974). Em um caso clínico detectou-se uma aberrante interação larva-tecido que causou miosite necrosante severa dos membros pélvicos, além de encefalomielite multifocal do cérebro e medula espinhal. Neste paciente, cinco *D. immitis* estavam no ventrículo direito e grande quantidade nas artérias pulmonares (COOLEY; CLEMMONS & GROSS, 1987).

Dentro de três dias após a chegada dos parasitos imaturos nas artérias pulmonares, aparecem lesões na parede arterial, em decorrência da reação ao agente patogênico. Estas modificações arteriais iniciam com uma série de alterações que incluem: aumento de volume das células endoteliais, alargamento das junções intercelulares, aumento da permeabilidade endotelial e subsequente desenvolvimento de edema periarterial. O extravasamento de fluido dos vasos pode ser tão severo ao ponto de causar infiltrados alveolares e intersticiais radiograficamente aparentes. Em seguida, observa-se um enrugamento endotelial que favorece a adesão sucessiva de células sangüíneas brancas ativadas e plaquetas. Estas últimas liberam fatores tróficos que estimulam células musculares lisas a migrarem em direção ao lume arterial e estimulam a produção de colágeno. Em torno de três semanas, a proliferação das células musculares e o colágeno formam vilosidades endoteliais patognomônicas, que causam o estreitamento da luz das artérias pulmonares (RAWLINGS & CALVERT, 1995). As projeções endoteliais e a arterite decorrente favorecem a produção de microtrômbolos, o desenvolvimento de trombose e a reação tecidual granulomatosa perivascular (NELSON & COUTO, 1998). Todas estas respostas teciduais, por serem muito recentes, não são geradas por alterações hemodinâmicas e sim, pelo próprio contato com o parasito. Além disso, quando os parasitos crescem, geralmente movem-se para as artérias maiores e tronco pulmonar principal, causando inflamação nos mesmos. Todas as lesões são semelhantes e a maior parte delas situa-se nas artérias pulmonares direitas, notadamente, nos ramos periféricos da artéria diafragmática direita (ATWELL, 1980). Como alteração morfológica macroscópica observa-se que as artérias afetadas perdem seu aspecto periférico normal e afilado passando a apresentar um padrão

proeminente e grosseiro, semelhante a uma “ameixa seca”. As maiores dilatam-se e podem até desenvolver aneurismas (CALVERT & RAWLINGS, 1983).

O parênquima pulmonar também sofre alterações, demonstrando consolidação em decorrência das lesões arteriais, além da fibrose, do edema focal e da pneumonite alérgica. Desta forma, provém a hipóxia alveolar que, em adição ao estreitamento do leito arterial, exacerba a resistência pulmonar (NELSON & COUTO, 1998). SIMPSON & JACKSON (1975) relacionaram três causas associadas ao aparecimento de pneumonia: 1) infiltração eosinofílica, resultante de resposta inflamatória aos parasitos recém chegados; 2) endarterite vilosa e 3) tromboembolismo, causando tosse, além de pneumonia.

Devido à diversidade de alterações pulmonares a resistência ao fluxo sangüíneo pulmonar se eleva em poucos meses. Como resultado, verifica-se um aumento da pressão arterial por causa das alterações morfológicas nas artérias. A hipertensão pulmonar, aliada à incapacidade do mecanismo compensatório em recrutar vasos colaterais e dilatar o leito arterial, dificulta o trabalho cardíaco em enviar sangue para os vasos pulmonares. Desta forma instala-se uma alta pós-carga que requer maior pressão sistólica cardíaca. Nesta fase, o coração é capaz de compensar a maior dificuldade de ejetar sangue, por meio da dilatação e hipertrofia ventricular direita (MUSSELMAN, 1975). Na ausência de tratamento, a hipertensão pulmonar torna-se crônica e pode ocorrer insuficiência do miocárdio. Em decorrência, sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva direita surgem, principalmente em conjunção com a insuficiência secundária da tricúspide. Portanto, há distensão atrial direita, congestão venosa sistêmica, ativação do sistema nervoso simpático e retenção renal de sódio, além de ascite e aumento do volume hepático e

esplênico. A congestão hepática crônica, secundária à dirofilariose, pode resultar em lesão hepática permanente e cirrose (NELSON & COUTO, 1998). O exercício físico exacerba o estado patológico do aparelho cardiovascular porque está associado ao aumento do fluxo sanguíneo pulmonar (DILLON; BRAWNER & HANRAHN, 1995). A deficiente irrigação sanguínea nos diversos órgãos supridos pelo coração causa dispnéia, tosse e fraqueza (SIMPSON & JACKSON, 1975). A ausculta torácica pode revelar sons pulmonares aumentados ou anormais, como crepitações, segunda bulha cardíaca freqüentemente mais alta, sopro de ejeção na base cardíaca esquerda, sopro da insuficiência da tricúspide ou arritmias cardíacas que podem ser detectados com certa variação durante a auscultação (NELSON & COUTO, 1998). A insuficiência cardíaca também leva à ativação de outro mecanismo fisiológico compensatório, o sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Outra manifestação severa da dirofilariose, quando da infecção massiva por *D. immitis* na veia cava caudal, é a denominada “síndrome da veia cava” ou “síndrome da insuficiência hepática” que ocorre repentinamente, por insuficiência cardíaca e hepática simultâneas (SAWYER, 1975b). O bloqueio venoso reduz o retorno do fluxo sanguíneo para o coração e diminui a perfusão nos rins e fígado; com isso, ocorre a insuficiência destes órgãos. A hemoglobinúria parece ser um sinal patognomônico desta síndrome devido à coagulação intravascular disseminada, induzida pelo turbilhonamento de sangue sobre a massa de parasitos (JACKSON, 1975a). Nestes casos, a mortalidade é alta, pois os animais rapidamente desenvolvem anemia e dispnéia, devido à hemólise intravascular e à hipóxia causada pelos defeitos pulmonares.

As microfilárias, quando em grande concentração nos capilares da pele,

também podem causar lesões como dermatite, evidenciada por prurido e alopecia (LEVINE, 1974).

As alterações morfológicas são mais severas após a morte das dirofilárias, pois, desta forma, os parasitos ficam expostos aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, inicia-se uma intensa resposta inflamatória granulomatosa e trombose. Há uma proliferação excessiva das vilosidades da camada mioíntima, com perda de endotélio arterial, que proporciona maior permeabilidade aos fluidos e às proteínas sangüíneas. Ocorre coagulação local severa que pode ser capaz de causar uma coagulopatia intravascular disseminada. A exagerada proliferação vilosa causa obstrução do fluxo sangüíneo nas artérias lobares caudais e intermediárias. Tal interrupção de fluxo, aliada à incapacidade de distensão pulmonar, aumenta a pressão intraluminal de modo a distender as maiores artérias pulmonares e a elevar a pós-carga ventricular direita. Pode-se encontrar na porção pulmonar caudal vias áreas pulmonares hemorrágicas ou edematosas, neste caso, sobrevem a hemoptise (CALVERT & RAWLINGS, 1983). Em felídeos sinais letais ocorrem após a morte da *D. immitis*. Isto pode ser explicado por diferenças nas lesões pulmonares. O cão demonstra edema celular severo e focal das células alveolares tipo I (células da borda epitelial) além de fibrose. Esta lesão dificulta a troca gasosa e causa hipóxia alveolar. Nos gatos observa-se uma hiperplasia das células alveolares do tipo II (produtoras de surfactante) formando uma barreira à oxigenação, e também um infiltrado eosinofílico marcante em áreas focais do pulmão. Além disso, nos felinos, há uma intensa atividade de macrófagos pulmonares intravasculares que liberam citocinas. O edema intersticial difuso e a congestão pulmonar nos gatos podem estar associados a essas citocinas. Não se sabe ao certo a causa das lesões pulmonares,

mas tanto no cão quanto no gato tal fato causa hipóxia alveolar e não parece estar associado à localização física dos parasitos adultos nem à obstrução do fluxo ou ao infarto (DILLON; WARNER & MOLINA, 1995).

Em quatro a seis semanas após o tratamento contra o parasito adulto ocorre redução das alterações nas artérias pulmonares proximais. Em seis meses há a reversão da hipertensão pulmonar. As grandes artérias pulmonares diminuem em tamanho e a tortuosidade se corrige assim que a hipertensão baixar. No caso das artérias menores há redução dos aneurismas e dilatações, mas elas permanecem com algumas anormalidades residuais (CALVERT & RAWLINGS, 1983).

Segundo SIMPSON & JACKSON (1975) lesões glomerulares renais degenerativas podem surgir em cães com dirofilariose, devido à atividade das microfilárias. Entretanto, outros pesquisadores relatam que a excessiva formação de complexos imunes circulantes são os principais responsáveis pela patogênese da nefropatia (GRAUER; CULHAM; DUBIELZIG *et al.*, 1989). Além da lesão renal, acrescenta-se a granulomatose eosinofílica pulmonar como outra complicação imunomediada atribuída à dirofilariose. Em alguns cães esta alteração envolve, provavelmente, uma combinação de hipersensibilidade imediata e reações imunes mediadas por células, aos antígenos da *D. immitis* (DOW & LAPPIN, 1995).

3.8.1 Aspectos Hematológicos

Nota-se que a hematologia dos cães com dirofilariose varia amplamente e as possíveis alterações listadas são: anemia normocítica e normocrômica, contagem normal de neutrófilos, com ressalva ao número de basófilos que tende a aumentar

na infecção crônica. A neutrofilia está presente em 75 a 80% dos cães com insuficiência cardíaca congestiva direita. Aproximadamente 85% dos cães microfilarêmicos e 95% dos amicrofilarêmicos têm eosinofilia. A basofilia aparece em 50% dos cães e normalmente está associada à eosinofilia. A linfopenia ocorre em quase todos os cães infectados, pois reflete uma resposta ao estresse causado pela doença. Os níveis de fosfatase alcalina sérica estão normais. O achado de azotemia é raro, mas pode estar presente em cães com a doença moderada a severa e com comprometimento renal. Os níveis de β globulinas séricas normalmente estão elevados, contrastando com os níveis de albumina que estão reduzidos. Em 20% dos cães com sintomatologia sutil a moderada há proteinúria, sendo que quase todos os animais com insuficiência cardíaca congestiva são proteinúricos. Uma leve hipóxia pode ser detectada em aproximadamente 30% dos casos e é atribuída à doença arterial pulmonar. A maioria dos cães hipoxêmicos demonstra valores ácido-básicos normais, mas uma acidose metabólica pode ocorrer devido à acidose láctica (CALVERT & RAWLINGS, 1983).

3.8.2 Aspectos Imunológicos

Com relação às respostas humorais a imunoglobulina IgM é a primeira a ser detectada, a partir de duas semanas após a infecção, decaindo no início da fase microfilarêmica. Somente em 11 a 16 semanas detecta-se IgG, que permanece elevada por um período desconhecido. Além daqueles, a IgE aparece em altos títulos no soro sanguíneo de cães com filárias (CORWIN, 1983). A habilidade do parasito em induzir uma resposta de anticorpos com alto título de IgE foi elucidada

quando comprovaram a presença de componentes alergênicos nas formas adultas e nas microfilárias de *D. immitis* (FUJITA & TSUKIDATE, 1984). GRIEVE; BROOKS; BABISH *et al.* (1982) sugeriram que a *D. immitis* induz uma diminuição da resposta imune nos animais infectados. Isto é demonstrado pela reduzida produção de anticorpos, que coincide com a presença inicial de microfilárias. Os valores baixos de anticorpos estão associados à insuficiência na indução da transformação de linfócitos, pois os cães infectados têm uma habilidade reduzida em mudar a produção de IgM para IgG, após exposição à um antígeno dependente de células-T. Este fenômeno deveria ser considerado como um mecanismo potencial promovido para sobrevivência da *D. immitis*. Além de que, pode predispor os cães infectados a outras doenças.

3.9 Diagnóstico

Para o diagnóstico de dirofilariose deve ser levado em consideração:

1. Anamnese e histórico clínico
2. Exame físico
3. Exames parasitológicos (pesquisa de microfilárias no sangue periférico):
 - 3.1. Teste direto, por exame do sangue a fresco;
 - 3.2. Teste de Knott modificado;
 - 3.3. Teste de filtração do sangue.
4. Exames sorológicos (ensaios enzimáticos imunoabsorventes – ELISA)
5. Exames diagnósticos por imagem:
 - 5.1. Exame radiográfico;

- 5.2. Exame angigráfico e angiocardigráfico;
- 5.3. Exame ultra-sonográfico.
- 6. Exame eletrocardiográfico
- 7. Outros exames laboratoriais
 - 7.1. Hemograma;
 - 7.2. Análise da Bioquímica Sérica;
 - 7.3 Urinálise.
- 8. Necropsia

Durante a obtenção do histórico de um paciente com suspeita de dirofilariose, deve-se levar em consideração alguns dados epidemiológicos. Desta forma, investiga-se sobre a vivência do animal em alguma região endêmica à doença, bem como do tempo de permanência naquele local. Em se tratando de uma região endêmica, deve-se observar o porte dos animais. Normalmente, os cães de raças grandes permanecem fora de casa e, por isso, têm maior risco de se infectarem do que os de raças pequenas. Com relação ao sexo, cães machos são acometidos quatro vezes mais que as fêmeas, no entanto, não há diferença quando se trata de raça ou idade (NELSON & COUTO, 1998).

O exame físico pode revelar sinais sugestivos de dirofilariose, auxiliando no diagnóstico, mas são de menor importância uma vez que a maioria dos animais é assintomático. Os sinais que sobrevêm com a doença não serão aqui discutidos, pois já foram abordados na parte 3.8, referente à patofisiologia e sinais clínicos da dirofilariose.

O método confirmativo para a detecção da dirofilariose é a identificação de microfilárias no sangue periférico. Para isto, vários métodos podem ser utilizados

como o teste do hematócrito. Neste, o tubo de microhematócrito é preparado na forma usual e centrifugado. Examina-se, ao microscópio, as microfilárias em movimento na porção plasmática, acima do coágulo. Dentre os exames, este é o menos satisfatório, uma vez que não fornece dados que diferenciem as microfilárias encontradas (LEVINE, 1974).

Todavia, há outros testes detectantes de microfilárias que permitem a realização da diferenciação das larvas com base na motilidade, tamanho e aspectos morfológicos. O número de microfilárias no sangue também pode sugerir a espécie de parasito. Além da diferenciação, estes testes determinam se a terapia microfilaricida é necessária.

O exame direto do sangue fresco é um teste detectante de microfilárias que não exige procedimento especial, entretanto, permite a avaliação da motilidade das larvas (LEVINE, 1974).

As técnicas de concentração e de fixação, além de detectarem as microfilárias, permitem a realização do exame morfológico e a mensuração das mesmas. A técnica de Knott modificada é considerada como a de escolha para o exame de rotina na prática veterinária, nos Estados Unidos da América do Norte (EUA). Não é um teste caro, pois baseia-se na centrifugação do sangue. Seu processo envolve a fixação das microfilárias por meio de uma solução de formalina a 2% e faz com que as microfilárias se retraiam em diminuta proporção. Apesar da pequena diminuição do tamanho, a maioria dos pesquisadores utiliza o Knott modificado como padrão para avaliação das características morfológicas e mensuração das microfilárias (JACKSON & OTTO, 1975).

A outra técnica que envolve a concentração de microfilárias é a de filtração do

sangue, descrita primeiramente por WYLIE (1970) e que recebeu subsequentes modificações. Assim como o princípio do teste de Knott modificado, o teste de filtração envolve o preparo do sangue com uma solução que promove a hemólise e a fixação das microfilárias presentes. Entretanto, o modo de concentrar as larvas é por filtração do sangue.

O teste da fosfatase ácida tem sido o melhor método para diferenciar as microfilárias de *D. immitis* das de *D. reconditum*, porque permite que elas se coram diferentemente. Apesar deste método ser eficaz é impraticável na rotina médica, uma vez que exige tempo, uma série de reagentes químicos, estufa e uma chama de fogo, entre outros equipamentos (CHALIFOUX & HUNT, 1971). Além disso, alguns dos reagentes químicos necessários para a realização desta técnica só estão disponíveis no exterior (EUA, Europa).

Não completamente satisfeitos com os testes anteriores, os pesquisadores começaram a adotar outras metodologias para o diagnóstico de dirofilariose. Assim, em 1966 o teste de fixação de complemento foi comparado com o de hemaglutinação. O teste de fixação do complemento detectou anticorpos nos cães com dirofilariose, mas não detectou antes de três meses da infecção experimental. Entretanto, com a hemaglutinação indireta os anticorpos foram detectados em duas semanas da infecção. Após o nono mês da infecção não foi possível detectar os anticorpos em ambos os testes, invalidando-os. A hemaglutinação indireta foi o mais sensível, mas houve reação cruzada com *Toxocara canis* e outros parasitos de cães (PACHECO, 1966).

Na década de 70 a “American Heartworm Society” indicava apenas o diagnóstico por base nos testes detectantes de microfilárias, desde que associados

com exames radiográficos (BORING, 1975).

Na década de 80 o teste de anticorpo fluorescente indireto (IFA) foi utilizado para o diagnóstico de dirofilariose oculta. Este teste detecta a imunoglobulina G (IgG) contra os antígenos das microfilárias da *D. immitis*. Porém, aproximadamente 20% dos cães com dirofilariose oculta não têm anticorpos antimicrofilárias detectáveis, proporcionando resultados falsos negativos. As possíveis situações para o resultado ser falso negativo em IFA são 1) infecções precoces (baixos níveis de anticorpos circulantes); 2) presença de parasitos estéreis, 3) falta da produção de microfilárias (infecção unissex) e 4) ausência de resposta do hospedeiro ao antígeno de superfície da microfilária. Nestes casos, a dirofilariose era diagnosticada por meio das alterações cardiopulmonares radiográficas (CALVERT & RAWLINGS, 1983). Portanto, a IFA não é útil devido sua pequena especificidade.

No final da década de 70 e durante a década de 80 vários ensaios enzimáticos imunoabsorventes (ELISA) detectantes de anticorpos anti-antígeno de *D. immitis* foram desenvolvidos e introduzidos. Estes testes utilizavam uma mistura de antígenos dos adultos da *D. immitis*, portanto, eram muito sensíveis (detectavam eficientemente infecções precoces e infecções com pequeno número de parasitos). Entretanto, não eram específicos e acreditava-se ocorrer reação cruzada com parasitos intestinais, comuns de cães. Uma pesquisa mostrou que o resultado positivo poderia indicar várias situações como 1) presença de dirofilárias adultas no coração, nas artérias pulmonares ou em qualquer local ectópico; 2) presença de infecção prepatente, pois este teste detecta anticorpos em oitenta dias após a infecção; 3) o paciente que apresentava dirofilariose e já foi tratado (com sucesso ou não) pois os anticorpos persistem em titulação alta até quatro semanas após o uso

de adulticidas; 4) o paciente que apresenta infecção por outro parasito nematódeo (exemplo: *D. reconditum*) cujos antígenos fazem reação cruzada com os anticorpos de *D. immitis*. Por outro lado, um resultado negativo poderia indicar: 1) falta de anticorpos anti-*D. immitis* devido à ausência de parasitos adultos; 2) imunossupressão ou 3) absorção de anticorpos por microfilárias (CORWIN, 1983). Este mesmo autor relata que as interpretações do teste acima descrito eram semelhantes para o teste de aglutinação em látex. Neste, partículas de látex eram revestidas com antígenos purificados extraídos de dirofilárias adultas.

Quando o primeiro teste ELISA detectante de anticorpos contra a *D. immitis* ("Dirotec: Malinckrodt, Inc.") foi comparado com o ELISA do laboratório de diagnóstico médico do Texas, houve discrepância nos resultados de 14 dos cem cães testados. Houve dúvidas, pois o teste de filtração destes 14 cães indicou que todos eram amicrofilarêmicos, sendo que apenas um cão apresentou vermes adultos no ventrículo direito ao exame necroscópico. Além disso, houve 98% de resultados falsos positivos neste estudo, que invalidou o ELISA em detectar infecção patente dentro de um nível aceitável de confiabilidade (SHEEN; SWEENEY & JONES, 1985). Em outro estudo comparou-se o teste ELISA detectante de antígeno ("Filarochek: Malinckrodt, Inc.") com o ELISA detectante de anticorpos contra a *D. immitis* (Dirotec: Malinckrodt, Inc.). O último teste era destinado a detectar não somente anticorpos contra os parasitos adultos, mas também infecções prepatentes e parasitos imaturos. No entanto, novamente foi criticado, pois mostrou uma taxa de resultados falsos negativos de quase 43%, enquanto que o ELISA detectante de antígeno teve 19% de falsos negativos (UTROSKA, 1986). Além destes, existiu, também, um teste ELISA modificado que detectava IgG e IgM usando dez antígenos diferentes

derivados de microfilárias e adultos de *D. immitis* (CORWIN, 1983) porém não foram relatados resultados de sua eficiência, bem como não há relatos da sua posterior utilização.

Dentre os testes atualmente disponíveis nos EUA, o teste imunológico por hemaglutinação ("VetRED, Rhone-Merieux, Inc.") foi o primeiro a ser introduzido, mas nem a sensibilidade e nem a especificidade são tão altas quanto nos testes ELISA antigênicos (KNIGHT, 1995).

Os testes ELISA para a detecção dos antígenos da *D. immitis* constituem quase que a totalidade dos existentes nos EUA e são considerados como metodologia padrão na atualidade. No entanto, existem pequenas diferenças na sensibilidade entre eles (KNIGHT, 1995). As maiores empresas fabricantes dos testes ELISA antigênicos, em diversos formatos, são a "IDEXX" e a "Synbiotics". A existência atual de sete diferentes testes imunológicos surgiu devido à necessidade de se obter um diagnóstico eficaz da dirofilariose. Cinco deles ("Snap[®] Canine Heartworm PF, PetChek[®], ASSURE[®] CH, DiroCHEK[®] e UNI-TEC[®]CHW") são ELISA e aprovados nos EUA. Um deles, o "VetRED[®]", baseia-se na hemaglutinação e outro, o "ICT GOLD[™]HW", fundamenta-se na imunocromatografia. Somente alguns deles são semiquantitativos e podem distinguir entre concentrações alta e baixa de antígeno da dirofilária circulante. O único teste deste tipo disponível no Brasil é o "Snap[®] Canine Heartworm PF" (McTIER; McCALL & SUPAKORNDEJ, 1995). Estes últimos autores listam todos os sete testes, mostrando suas diferenças com relação 1) ao princípio técnico empregado; 2) ao tipo de amostra que o teste aceita; 3) às espécies animais aprovadas e 4) à empresa fabricante (Tabela 1). Além disso, analisam os fatores que devem ser levados em consideração ao selecionar um teste antigênico

como 1) eficácia do teste; 2) facilidade no uso; 3) velocidade de realização do teste; 4) custo e outros aspectos como técnicas de armazenamento e de realização dos testes, também foram analisados.

Tabela 1 - Testes que detectam o antígeno da *Dirofilaria immitis*, disponíveis nos EUA para o diagnóstico de dirofilariose.

Tipo do teste / formato	Amostra	Nome	Espécies	Empresa
ELISA / placa	P, S	ASSURE CH	C, G	Synbiotics, San Diego, CA
ELISA / "microwell"	P, S	DiroCHEK	C, G	Synbiotics, San Diego, CA
ELISA / "microwell"	P, S	PetChek HTWM	C, G	IDEXX, Maine, USA
ELISA / membrana	P, S, T	Snap CHW PF	C, G	IDEXX, Maine, USA
ELISA / membrana	P, S, T*	UNI-TEC CHW	C, G	Synbiotics, San Diego, CA
Hemaglutinação / placa	T	VetRED	C	Rhone-Merieux, Lyon, France
Imunocromatografia / membrana	P, S, T	ICT GOLD HW	C	Synbiotics, San Diego, CA

FONTE: McTIER, T.L.; McCALL, J.W.; SUPAKORNDEJ, N. Features of Adult Heartworm Antigen Test Kits. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 115-120.

NOTA: P, plasma; S, soro; T, sangue total; C, aprovado somente para cães; C,G, aprovado para cães e gatos

*Não está aprovado com sangue total para gatos.

Como conclusão, McTIER (1994) e McTIER; McCALL & SUPAKORNDEJ (1995) relatam que apesar de haver pequenas diferenças e limitações entre os testes, todos eles são bons, mas nenhum é 100% eficaz. As comparações entre os testes não serão abordadas no decorrer do texto porque dentre eles, apenas o "Snap® Canine Heartworm PF" (fabricado pela empresa IDEXX) e o Witness®, um teste antigênico tipo ELISA mais recente (fabricado pela "Synbiotics") estão disponíveis no Brasil.

O teste mais recente, com formato diferente e mais rápido no diagnóstico de dirofilariose canina foi apresentado e descrito no simpósio de dirofilariose, em Auburn, Alabama, em 1995. Este teste imunocromatográfico foi denominado de "ICT GOLD™HW Canine Heartworm Antigen Test Kit" (Synbiotics Corp., San Diego, CA) e tem o formato baseado no uso de partículas coloidais de ouro. O princípio de ação é

semelhante aos outros testes, pois contém um anticorpo específico para o antígeno da *D. immitis* fêmea adulta, entretanto, tem a adição de um segundo anticorpo ligado às partículas de ouro coloidal. O “ICT GOLD™HW Canine Heartworm Antigen Test Kit” mostrou uma sensibilidade de 98,9% quando havia, no mínimo, três parasitos fêmeas adultos e 94,2% quando da presença de pelo menos uma fêmea. A especificidade do teste foi de 100%, portanto, mostrou ser eficaz e muito útil no diagnóstico de dirofilariose canina (BLAND; McTIER; TREEMAN *et al.*, 1995).

Uma vez que os testes supracitados falham em detectar infecções prepatentes o objetivo atual dos pesquisadores é, justamente, descobrir uma forma de detectar a doença de forma mais precoce. Assim, HONG; MEJIA; NKENFOU *et al.* (1995) identificaram uma proteína com características antigênicas (DiT33) que é expressada por parasitos adultos, microfilárias e por larvas de quarto estágio de *D. immitis*. Este antígeno foi clonado e expressado por uma bactéria como uma proteína ligada à maltose (MPB). Após várias análises sorológicas verificaram que havia uma resposta significativa de anticorpos, contra àquela proteína. Os anticorpos foram detectados com ELISA, em amostras coletadas de animais com a infecção prepatente, patente e oculta por *D. immitis*. Além disso, o DiT33 não reage com o soro colhido de cães infectados por parasitos intestinais ou por *Dipetalonema reconditum* ou de cães recebendo medicamentos profiláticos para dirofilariose. Os resultados preliminares indicam que a DiT33 é um antígeno promissor para a detecção precoce da dirofilariose e também pode ser de grande valor no controle da dirofilariose (HONG; MEJIA; NKENFOU *et al.*, 1995).

Os exames radiográficos, nos cães cujo ELISA foi positivo, revelam ser um procedimento fundamental para determinar a severidade das alterações cardíacas e

dos vasos pulmonares (JACKSON, 1969). As alterações radiográficas cardíacas, vasculares e pulmonares podem ser facilmente detectadas. Para isto, deve-se combinar radiografias de ótima qualidade com uma interpretação cuidadosa. Nas décadas de 40 e 50 já haviam sido reconhecidos um grande número de sinais radiográficos, gerados pela dirofilariose. A primeira alteração relatada foi o aumento da artéria pulmonar principal (HOLMES, 1985). Na década de 70 relatou-se a presença constante de uma “tríade” clássica de achados radiográficos. Incluía a proeminência da artéria pulmonar, aumento do ventrículo e do átrio direito e áreas radiopacas pulmonares, indicando consolidação de parênquima pulmonar secundária à trombose (BORING, 1975). Como as dirofilárias passam grande parte da vida nas artérias pulmonares periféricas, maior atenção foi dada a estes vasos e ao parênquima pulmonar. Cães com grande aumento do ventrículo direito certamente apresentam grande aumento da artéria pulmonar principal. Quando os sinais radiográficos da doença evoluem, indicam que as lesões arteriais pioraram, além da existência de lesão no parênquima pulmonar, primariamente nos lobos caudais (CALVERT & RAWLINGS, 1983).

A angiografia e angiocardiografia são técnicas que permitem avaliar parte dos grandes vasos e as câmaras cardíacas, respectivamente. Envolvem a realização de radiografias realizadas poucos segundos após a injeção intravenosa de um meio de contraste. A angiocardiografia é capaz confirmar o diagnóstico de dirofilariose e indicar o tipo de tratamento: medicamentoso ou cirúrgico. Pode ser utilizada para localizar e mostrar a extensão das lesões e a presença de parasitos adultos nos vasos e ventrículo direito (TASHJIAN; LIU; YARNS *et al.*, 1970). Este método está indicado para dirofilariose, mas como envolve procedimentos e equipamentos

especiais, raramente são empregados na prática veterinária (ROOT & BAHR, 1998).

A ultra-sonografia é um método mais objetivo para a avaliação cardíaca direita, dilatação arterial pulmonar, além da presença de dirofilárias no ventrículo direito ou na artéria pulmonar principal. Caso haja suspeita de síndrome da veia cava, esta pode ser confirmada rapidamente pela ultra-sonografia. A presença de efusão pleural, pericárdica ou ascite, indicam insuficiência cardíaca direita (NELSON & COUTO, 1998).

A eletrocardiografia é o método menos eficaz em avaliar as alterações cardiovasculares causadas pela dirofilariose (HOLMES, 1985). Isto porque quando o aumento ventricular é sutil ou moderado os resultados geralmente não mostram alterações (CALVERT; LOSONSKY; BROWN *et al.*, 1986). A doença em estado avançado pode causar um desvio do eixo direito ou uma arritmia no exame eletrocardiográfico. Quando há insuficiência cardíaca direita congestiva aparecem alterações indicando aumento ventricular direito. Ondas P altas podem ocorrer indicando presença de aumento atrial (NELSON & COUTO, 1998).

Os exames laboratoriais de sangue também podem auxiliar na confirmação do diagnóstico de dirofilariose. Os exames indicados incluem hemograma, exames bioquímicos para testar a função hepática e renal, determinação das frações de β e γ -globulinas e urinálise. As alterações hematológicas não serão relatadas, pois já foram previamente elucidadas na parte 3.8, que descreve a patofisiologia e sinais clínicos da dirofilariose.

Notadamente, o diagnóstico de dirofilariose felina é mais difícil do que em cães devido à ausência de sinais patognomônicos, um quadro clínico consistente e um teste definitivo pelo qual o diagnóstico possa ser firmado. Portanto, ao contrário

do que é realizado em cães, os seguintes exames: necropsia, angiografia e radiografias são procedimentos diagnósticos com alto nível de sensibilidade. Os resultados dos testes que detectam microfilárias no sangue e os testes antigênicos podem ser úteis apenas para confirmar o diagnóstico (RYAN; GROSS & SOLL, 1995). Isto ocorre porque as microfilárias de *D. immitis* raramente são encontradas no sangue de gatos infectados. A sensibilidade dos testes ELISA antigênicos melhorou muito, mas ainda há muitos resultados falsos negativos (os testes detectam, provavelmente, apenas 40 a 50% dos gatos naturalmente infectados). As falhas são atribuídas, normalmente, à imaturidade dos parasitos ou devido ao baixo nível de antígenos pela presença de poucas fêmeas. Além disso, o teste sorológico só detecta animais positivos após 168 dias após a infecção natural ou experimental (McCALL; CALVERT & RAWLINGS, 1994). Os testes ELISA para detecção de anticorpos são mais sensíveis, mas perdem na especificidade em detectar o antígeno e ocorre infecção cruzada com outros nematódeos de gatos (ATKINS; ATWELL; DILLON *et al.*, 1997).

3.10 Tratamento e Profilaxia

Uma vez concluído o diagnóstico de dirofilariose, os animais acometidos devem ser submetidos a uma avaliação geral antes de iniciar o tratamento. Tal avaliação inclui, principalmente, pesquisa sobre o histórico do paciente, exame físico, exames sangüíneos laboratoriais e realização de radiografias torácicas. O propósito desta avaliação é determinar a extensão das lesões cardíacas e pulmonares, detectar qualquer alteração renal ou hepática, além de avaliar a

capacidade do paciente em resistir ao tratamento (DUNAVENT; KEISTER; TANNER *et al.*, 1995). O exame radiográfico proporciona melhor acesso à severidade das lesões nas artérias pulmonares e no parênquima pulmonar, sendo extremamente útil para que se possa estimar o prognóstico. Pois o risco de ocorrer tromboembolismo pulmonar após o tratamento contra o parasito adulto aumenta em cães com sinais clínicos e radiográficos de doença vascular pulmonar severa (NELSON & COUTO, 1998). Tal fato não implica que os cães assintomáticos estejam livres de alterações tissulares severas, pois estas podem estar presentes nos pulmões, fígado e rins mesmo na ausência de sinais clínicos importantes. Por este motivo, recomenda-se sempre a realização dos exames complementares mesmo em pacientes assintomáticos (JACKSON, 1975b). Os exames de sangue como hemograma, testes de função hepática, uréia e creatinina, além da urinálise, complementam as informações obtidas por meio dos exames físico e radiográfico. Antigamente, como a utilização das drogas organoarsenicais era intensa, e por elas serem hepato e nefrotóxicas, preocupava-se mais com alterações na função hepática e renal. Atualmente, para o tratamento com a droga mais recente (dicloridrato de melarsomina), que não é hepato e nefrotóxica, alterações na função hepática ou renal não limitam o seu uso. Entretanto, os exames podem estimar a carga parasitária e detectar disfunções secundárias em outros órgãos. Como por exemplo, enzimas hepáticas elevadas geralmente são detectadas em animais com alta carga parasitária, alertando o clínico para possíveis complicações, pois a destruição dos vermes poderá levar a um embolismo massivo (LEVINE, 1974). Todavia, é inevitável ocorrer certo grau de tromboembolismo pulmonar todas as vezes que as dirofilárias são destruídas. Neste caso, o prognóstico para as complicações tromboembólicas

depende muito de duas variáveis: a carga parasitária e a severidade da doença vascular pulmonar. Estas duas variáveis podem ser avaliadas por meio de testes antigênicos e radiográficos, respectivamente. Quanto maior a carga de dirofilárias e mais severa a endarterite e a fibrose obstrutiva, maior será o risco de haver febre, tosse, dispnéia, hemoptise ou morte durante o período de convalescência do tratamento contra o parasito adulto (KNIGHT, 1995). Cada paciente deve ser avaliado como um novo caso e na presença de qualquer doença concomitante, esta deve ser tratada antes do tratamento da dirofilariose ser iniciado. Sabe-se que a idade não é um fator limitante para iniciar o tratamento e sim a condição do animal (JACKSON, 1975b). Alguns trabalhos foram realizados alegando os efeitos benéficos do ácido acetil salicílico, mas sua utilização anterior ao tratamento de dirofilariose ainda não está recomendada, por falta de resultados que comprovem seu efeito antitrombótico (NELSON & COUTO, 1998).

Os pacientes positivos para dirofilariose devem ser tratados, mesmo sendo assintomáticos (CORWIN, 1983). O tratamento *per se* pode ser medicamentoso ou cirúrgico e é planejado pelos resultados dos exames complementares. Inicia-se com o objetivo de eliminar todos os parasitos adultos para, em seguida, prosseguir com o tratamento microfilaricida (COURTNEY & JACKSON, 1975).

O arsenical tiacetarsamida sódica ("Caparsolato[®]", Sanofi, Overland Park, KS") tem sido usado para o tratamento de cães com dirofilárias adultas desde 1947 (JACKSON & OTTO, 1981 *appud* LEIB; ALLEN & HUSTED, 1984). Na década de 70 e início da 80, a única droga realmente eficaz e disponível ainda era a tiacetarsamida sódica, na dose de 0,22 mL/kg, por via intravenosa, duas vezes ao dia, por dois dias. Alguns cuidados especiais eram tomados com a administração devido ao fato do

medicamento ser muito irritante se extravasar para a região perivascular. Certos efeitos colaterais podem aparecer em poucas horas da injeção, principalmente o vômito. Adicionalmente, pode aparecer: anorexia, bilirrubinúria, icterícia, azotemia, uremia ou proteinúria, devido à hepato e nefrotoxicidade desta droga (JACKSON, 1975b). LEIB; ALLEN & HUSTED (1984) relataram a ocorrência de insuficiência renal aguda associada ao tratamento com tiacetarsamida em cães. Contudo, a maior parte dos cães tratados com arsenicais mostram pouca ou nenhuma reação à destruição dos parasitos adultos (LEVINE, 1974; CALVERT & RAWLINGS, 1983). Portanto, apesar da tiacetarsamida ser útil, sua eficácia filaricida raramente é completa, além de ter as seguintes desvantagens: proporciona efeitos colaterais indesejáveis, muitas doses devem ser injetadas e a administração requer grandes cuidados (KNIGHT, 1994).

Um novo organoarsenical para a utilização contra o parasito adulto: o dicloridrato de melarsomina (RM340) (Immiticide[®], Rhone-Merieux, Inc.) foi descoberto em 1942, mas o desenvolvimento para o uso em cães e em outras espécies começou em 1985. O atraso no desenvolvimento deve-se à utilização dos arsenicais para o tratamento das doenças tropicais em pessoas (KEISTER; TANNER & MEO, 1995). Somente em setembro de 1995 o Immiticide[®] foi liberado pelo "U.S. Food and Drug Administration (FDA)" nos Estados Unidos, apesar do persistente uso da tiacetarsamida. Na Europa e Austrália a melarsomina já vinha sendo utilizada clinicamente alguns anos antes de 1995. A vantagem da melarsomina está na sua eficácia contra parasitos imaturos e maturos de *D. immitis* que é muito superior à da tiacetarsamida. De modo geral, o tratamento padrão com a melarsomina é capaz de eliminar 100% dos machos 98% das fêmeas, em contraste, a tiacetarsamida tem taxas de eliminação de 33% a 90%, respectivamente (RAWLINGS & McCALL, 1996).

Além disso, a melarsomina possui outras vantagens: 1) faz retenção de arsênico cinco vezes maior e tem um *clearance* três vezes menor, caracterizando-se como droga de baixa toxicidade hepática e renal (LARSSON; PEREIRA; DOMINGOS *et al.*, 1997); 2) a administração intramuscular (IM) profunda causa pequena reação local transitória, ao contrário da intensa periflebite causada pelo extravasamento de tiacetarsamida; 3) a melarsomina praticamente não causa efeitos colaterais; 4) há possibilidade de controlar parcialmente a taxa em que os adultos serão destruídos com o regime de doses. A dose padrão é de 2,5 mg/kg, IM. Recomenda-se que duas administrações devam ser realizadas, com intervalo de 24 horas (KNIGHT, 1995). A droga é rapidamente absorvida e distribuída pelos tecidos. O metabolismo ocorre no fígado e seus metabólitos são excretados pelas fezes e urina (KEISTER; TANNER & MEO, 1995). AUTEFAGE (1990) indica que a musculatura lombar é um bom sítio para a administração da injeção intramuscular, pois, anatomicamente, é uma área de boa drenagem linfática, rica vascularização e possui poucos planos fasciais. Além disso, é uma região de difícil acesso para os cães, impedindo autotraumatismos, e a gravidade pode ajudar a reter o medicamento dentro dos músculos, evitando o acúmulo subcutâneo. RAWLINGS *et al.* (1993) ao compararem o tratamento com tiacetarsamida e melarsomina, verificaram que a última foi mais eficaz, no entanto, não houve diferença na severidade da hipertensão pulmonar e do tromboembolismo pós-tratamento. Pode-se observar, como efeitos colaterais após o tratamento recomendado, salivação, respiração ofegante, letargia, vômito e anorexia. As reações no sítio da injeção são sutis ou inexistentes. Os órgãos alvos, aos efeitos toxicológicos, parecem ser os pulmões, mas a patofisiologia deste achado é desconhecida (KEISTER; TANNER & MEO, 1995).

A determinação da severidade da doença é interessante para o planejamento do protocolo terapêutico e para a predeterminação do prognóstico. O Tabela 2 é um modelo para classificar a severidade da dirofilariose em cães com relação aos sinais clínicos, radiográficos e alterações clinicopatológicas, segundo NELSON & COUTO (1998).

Tabela 2 – Classificação da severidade da dirofilariose em cães, com base nos sinais clínicos, radiográficos e nas alterações clinicopatológicas.

Classe	Sinais clínicos	Sinais Radiográficos	Alterações Clinicopatológicas
1 (sutil)	Nenhum, ou tosse ocasional, fadiga ao exercício, ou sutil perda de condicionamento físico	Nenhum	Nenhuma
2 (moderada)	Nenhum, ou tosse ocasional, fadiga ao exercício, ou leve a moderada perda de condicionamento	Aumento ventricular direito e/ou aumento da artéria pulmonar, \pm opacidades perivascularares mista alveolar/intersticial	\pm anemia leve (Ht 20-30%), \pm proteinúria ($\geq 2+$)
3 (severa)	Perda geral de condição física ou caquexia, fadiga ao exercício, tosse ocasional ou persistente; \pm dispnéia; \pm insuficiência cardíaca congestiva direita	Aumento ventricular direito e \pm atrial, aumento moderado a severo da artéria pulmonar; opacidades perivascular ou difusa: mista alveolar/intersticial; \pm evidência de tromboembolismo	\pm anemia (Ht < 30%), (\pm proteinúria $\leq 2+$)
4 (muito severa)	Síndrome da veia cava (ver 3.8 Patofisiologia e sinais clínicos)		

FONTE: NELSON, R.W.; COUTO, G. Small animal internal medicine. Philadelphia: Mosby, 1998. p. 162–179.
 NOTA: Ht = hematócrito

De acordo com os dados fornecidos pela tabela acima, os cães classificados como da classe 1 (doença sutil) ou classe 2 (moderada) devem ser tratados com o protocolo padrão. Para os cães com doença severa (classe 3) ou para aqueles da classe 2, em que se deseja uma intervenção menos agressiva, institui-se o regime alternativo de dosagem. Os cães com síndrome da veia cava (classe 4) não deveriam ser tratados com melarsomina até que haja remoção cirúrgica dos parasitos (NELSON & COUTO, 1998).

O regime alternativo consiste em uma primeira administração na mesma dose do tratamento padrão (2,5 mg/kg, IM). Após o intervalo de um a dois meses, aplica-se mais duas injeções, semelhantemente ao protocolo padrão: 2,5 mg/kg, IM, com intervalo de 24 horas. Este esquema de aplicações ocorre para evitar a morte massiva de parasitos e o concomitante tromboembolismo, uma vez que, aproximadamente, 50% dos vermes adultos são mortos logo após a primeira injeção. Outra vantagem destas três aplicações separadas é que mais dirofilárias podem ser eliminadas quando compara-se com o regime padrão de duas aplicações (RAWLINGS & McCALL, 1996). O tratamento de cães (classe 2) com melarsomina mostrou redução de antígeno da dirofilária circulante significativamente maior do que a terapia com tiacetarsamida (MILLER; KEISTER; TANNER *et al.*, 1995). Em cães da classe 3 a melarsomina, administrada em regime alternativo, também foi eficaz em reduzir ou eliminar a carga parasitária e diminuiu a mortalidade a uma taxa de 4,6%, devido à doença tromboembólica (CASE; TANNER; KEISTER *et al.*, 1995).

O tratamento com melarsomina mata quase todos os adultos até o 38º dia do início da terapia, mas os antígenos sangüíneos diminuem em níveis significativamente baixos somente aos 88 dias após o tratamento (KEISTER; TANNER & MEO, 1995). Por isso, os testes sorológicos devem ser realizados em quatro meses após o tratamento com melarsomina. Neste prazo, os resultados são negativos em mais de 80% dos cães. Se o paciente permanece antígeno-positivo, o tratamento pode ser repetido e, nestes casos, a soroconversão é de 100% (NELSON & COUTO, 1998).

Tradicionalmente, após quatro a seis semanas da terapia contra o parasito adulto, faz-se o tratamento microfilaricida. Há inúmeras drogas que têm este

propósito como o fention, dietilcarbamazina, levamisol e iodeto de ditiazanina. Entretanto, devido à maior segurança e eficácia, mesmo em doses baixas, as lactonas macrocíclicas (ivermectina e milbemicina oxima) são as drogas de escolha (BLAGBURN, 1994). A ivermectina ("Ivermectina[®], Holliday-Scott S.A., Argentina; Ivomec[®] ou Hearnard 30[®], Merck AgVet, Rahway, NJ"), uma avermectina, administrada em dose única de 50 µg/kg, por via oral, é segura também para cães da raça Collie. Os cães desta raça podem mostrar sensibilidade exacerbada aos efeitos tóxicos da ivermectina em doses maiores. A milbemicina oxima ("Interceptor[®], Ciba Animal Health, Greensboro, NC") na sua dose preventiva (500 a 999 µg/kg) é microfilaricida e serve como droga alternativa à ivermectina. Acredita-se que a milbemicina oxima tenha ação interferindo na neurotransmissão mediada pelo ácido γ-aminobutírico nos invertebrados (assim como a ivermectina). O tratamento realizado com qualquer uma das duas drogas pode ser repetido, a cada duas semanas, até que as microfilárias não sejam detectadas no sangue (NELSON & COUTO, 1998). O levamisol ("Levasol, Malinckrodt, Mundelein, IL") e o fention ("Spotton, Miles, Shawnee, KS") têm sido usados, embora sejam menos efetivos que os macrolídeos e, além de mostrarem uma série de efeitos adversos, devem ser administrados por longo período (sete a 14 dias) (NELSON & COUTO, 1998). Apesar de não ser indicado como medicamento preventivo a melarsomina, em dosagem contra o parasito adulto, mata a maioria dos estágios de *D. immitis* (RAWLINGS & McCALL, 1996).

Após a eliminação das microfilárias o paciente é submetido ao protocolo preventivo. Para isto, recomenda-se a administração mensal das lactonas macrocíclicas ivermectina e milbemicina oxima. Quando administradas

mensalmente, são altamente eficazes (quase 100%) em prevenir a maturação da *D. immitis* ao seu estágio adulto (BLAGBURN, 1994). A “American Heartworm Society” recomenda que, para a quimioprofilaxia eficaz e segura, o macrolídeo deve ser administrado por via oral e iniciado nos cães com a idade de seis a oito semanas. Além disso, todo cão recebendo tratamento preventivo deve ser testado para presença eventual de antígenos circulantes e de microfilárias. A ivermectina é utilizada em dosagem menor que a microfilaricida e consiste em 6-12 µg/kg, por via oral. A milbemicina oxima é administrada na dose de 500-999 µg/kg, por via oral. Ambas as drogas são administradas mensalmente (LOK & KNIGHT, 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O Paraná é um estado integrante da Região Sul e do Planalto Meridional Brasileiro. Localiza-se entre 22° 29' 33" a 26° 42' 59" latitude sul e 48° 02' 24 a 54° 37' 38" longitude oeste e abrange uma área de 201 mil km². Caracteriza-se por ocupar um espaço transicional entre as regiões tropical e subtropical (TROPPMAIR, 1990). Segundo MAACK (1968), o Paraná está dividido em cinco grandes unidades geomorfológicas:

- Zona Litorânea que incorpora a orla marítima e a orla da serra;
- Serra do Mar;
- Primeiro Planalto;
- Segundo Planalto ou Planalto de Ponta Grossa;
- Terceiro Planalto.

A pesquisa em questão foi realizada, segundo à divisão acima, na Zona Litorânea, envolvendo tanto a região da orla marítima quanto a da serra. Durante o experimento, a Zona Litorânea foi dividida estrategicamente para permitir que toda a extensão do litoral paranaense fosse incluída na pesquisa. Nestas regiões foram realizadas colheitas de sangue dos cães que participaram do experimento. As colheitas de sangue foram divididas em diversas séries que compreenderam, aproximadamente, vinte cães por série e tal procedimento ocorreu no próprio local onde os cães residem. Em seguida de cada série de colheitas, os exames laboratoriais das amostras eram realizados no laboratório da Universidade Federal

do Paraná, em Curitiba.

4.2 Local da realização da pesquisa

A colheita do sangue dos cães foi efetuada na planície costeira do litoral paranaense, que abrange uma área de aproximadamente cinco mil km². Dentro desta região foram listados vários locais para permitir a abrangência de grande parte da extensão litorânea. Ainda, em cada local, eram selecionadas áreas basicamente constituídas por moradores nativos do litoral. A população do litoral paranaense perfaz um número de, 207.526 habitantes, segundo o IBGE (1996).

O clima nesta planície é quente e úmido, pois está associado à maritimidade. A precipitação anual acusa valores de mil mm³ e temperaturas médias de 20 a 22° C, enquanto que a média das máximas alcança 28 a 30° C e a média das mínimas 12 a 14° C. O clima das regiões do litoral paranaense, segundo a classificação de Koeppen, é do tipo **Aft** em que **A** significa que a média do mês mais frio é superior a 18° C, **f** que não há estação seca e **t** que ocorrem geadas esporádicas (neste caso na porção sul da planície). A sedimentação marinha, a pequena profundidade do lençol freático e o alto índice de precipitação contribuíram para a existência de solos com textura arenosa, alto teor de sal, baixo pH e baixa fertilidade. Estas características do solo permitem a existência de mangue, vegetação de praia e restinga. Entre outras vegetações, há muitas variedades de pteridófitas e bromeleáceas terrestres e epífitas. Apesar de vasto, este geossistema sofre o impacto de ações antrópicas pela destruição dos manguezais, seja para o aproveitamento da madeira, seja pelo aterramento destas áreas, visando a obtenção

de novos espaços para loteamentos ou expansão de áreas agrícolas com culturas de bananas e mandioca (TROPPMAIR, 1990).

Uma das regiões onde foi realizada a pesquisa, em Guaraqueçaba, é uma Área de Proteção Ambiental (APA). As APA's têm como objetivos principais conservar a diversidade de ambientes, de espécies, de processos naturais e conservar o patrimônio cultural. A APA de Guaraqueçaba localiza-se no litoral norte do Estado do Paraná, abrange uma superfície de 346 mil ha e uma população de 7.777 habitantes. Esta área engloba em sua extensão continental, costeira e estuarina uma variedade de ambientes como a serra do mar, a planície costeira, algumas ilhas e manguezais. Possui uma enorme diversidade florística e faunística, sendo que esta se destaca por abrigar considerável número de espécies animais endêmicas e ameaçadas. Nesta região da Floresta Atlântica foram registradas várias espécies de mamíferos tais como: *Procyon cancrivorus* (mão-pelada, cachorro-mangueiro), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Panthera onca* (onça pintada), *Felis concolor* (onça-parda), *Felis pardalis* (jaquaticara), *Felis tigrina* (gato-do-mato), *Felis wiedii* (gato-maracajá), *Felis yagouaroundi* (gato-mourisco), *Galictis cuja* (furão), *Didelphis aurita* (gambá-de-orelha-preta), entre outras (IPARDES, 1997).

O presente trabalho, realizado no litoral paranaense, envolveu as seguintes regiões: Guaraqueçaba, Ilha das Peças, Ilha do Mel, Antonina, Morretes, Pontal do Paraná (Pontal do Sul, Ipanema, Shangrilá, Praia de Leste) Matinhos e Guaratuba (Figura 2).

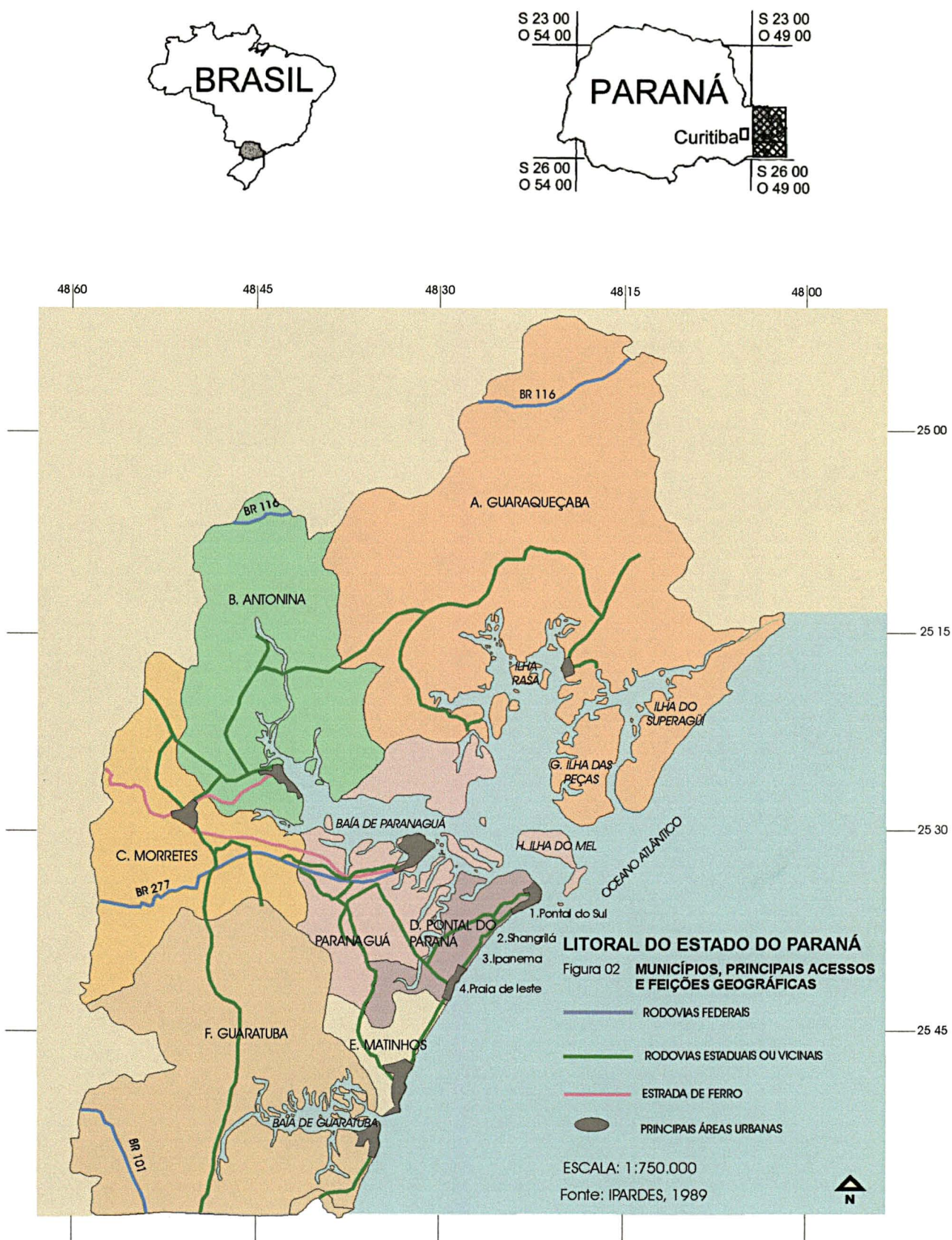


FIGURA 2

Mapas do Brasil, do estado do Paraná e do litoral paranaense. As regiões da pesquisa são: A. Guaraqueçaba, B. Antonina, C. Morretes, D. Pontal do Paraná (1. Pontal do Sul, 2. Shangrilá, 3. Ipanema, 4. Praia de Leste), E. Matinhos, F. Guaratuba, G. Ilha das Peças, H. Ilha do Mel.

As regiões selecionadas da planície litorânea, com sua respectiva população, segundo o IBGE (1996) incluem: Antonina (18.402 habitantes); Morretes (15.020 habitantes); Matinhos (19.995 habitantes); Guaratuba (31.635 habitantes); Guaraqueçaba (8.035 habitantes). Os balneários de Pontal do Sul, Ipanema, Shangrilá e Praia de Leste fazem parte de Pontal do Paraná, com 9.514 habitantes. A região de Praia de Leste pesquisada foi a zona rural. A Ilha do Mel e a Ilha das Peças pertencem a Paranaguá, que tem 124.920 habitantes.

Os exames laboratoriais das amostras biológicas, obtidas no litoral paranaense, foram realizados em ambiente especializado, utilizando microscópios ópticos, centrífuga, balança, refrigerador e vidrarias. O laboratório utilizado situa-se no departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

4.3 Seleção dos animais da pesquisa

A pesquisa envolveu 256 cães, todos escolhidos ao acaso, independentemente do sexo ou raça. Entretanto, todos os participantes da pesquisa foram, obrigatoriamente, selecionados por possuírem a idade mínima de um ano ou o tempo de vivência de um ano no litoral paranaense. A exigência de um ano faz-se necessária uma vez que as microfilárias e a antigenemia só aparecem no sangue após findado o período prepatente de, aproximadamente, sete meses. Os animais que receberam medicamentos como a ivermectina ou a milbemicina oxima também foram descartados, pois são drogas que alteram o resultado de alguns testes. Uma

vez que não há presença de canis municipais no litoral paranaense, todos os cães da pesquisa são de proprietários locais.

4.4 Cadastro dos animais da pesquisa

Para cada cão incluso na pesquisa era preenchida uma ficha (Anexo I) com os dados do animal e de seu proprietário. Os dados registrados incluíam nome, endereço e telefone do proprietário; nome, sexo, idade, raça, cor e tipo da pelagem do paciente. A ficha individual continha um espaço destinado à realização de uma enquete com os proprietários. Tal questionário interrogava sobre a situação financeira da família, os hábitos de vida do cão e dados sobre possível medicação (vermífugo) administrada nos últimos dias ou meses aos animais. Além disso, deu-se ênfase às informações sobre o tempo de permanência do animal no local da pesquisa.

Após a obtenção da anamnese e histórico do animal, perguntas eram realizadas com o objetivo de investigar sobre as alterações do condicionamento físico, presença de tosse, cansaço ou edemas subcutâneos no animal. Além disso, era realizado um restrito exame físico, consistindo apenas em: observação do animal, verificação da coloração das mucosas e do tempo de preenchimento capilar, visando identificar sinais condizentes com dirofilariose.

4.5 Período das colheitas de sangue

No período de 08.10.1998 a 27.05.1999 foi realizada a colheita de amostras sangüíneas dos cães das 11 regiões selecionadas. As colheitas foram divididas em 12 séries de, aproximadamente, 21 animais por série. O horário em que as amostras foram colhidas variou entre 9:00 e 17:00 horas.

4.6 Colheita e armazenamento do sangue

No total foram colhidas 256 amostras de sangue, provenientes de 256 cães do litoral paranaense.

A preparação dos animais para a realização do procedimento envolvia, inicialmente, a colocação de mordaca descartável e a contenção física dos animais, em decúbito lateral ou em estação. Em seguida, com a utilização de uma fita maleável de borracha, era feito um garrote na região da articulação umeroradioulnar e a região craniomedial do braço era preparada para a venopunção. Na região exposta do braço, os pêlos eram afastados e uma solução de álcool iodado era esfregada com auxílio de algodão. A quantidade de três mL de sangue era obtida por puncionamento da veia cefálica. Este procedimento era realizado utilizando-se seringas descartáveis com capacidade para 5 mL e agulhas descartáveis de calibre 26 G. Cuidadosamente, o sangue era acondicionado em tubo contendo anticoagulante (0,03 mL do sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético). Imediatamente após a colheita, os tubos eram armazenados em recipiente resfriado

de isopor e ao chegar no laboratório, em Curitiba, eram armazenados em um refrigerador à temperatura de 2 a 4° C.

4.7 Técnicas laboratoriais

Muitas técnicas vêm sendo utilizadas para examinar o sangue à procura de microfilárias de nematóides. No passado, o exame direto foi o mais comumente adotado pelos laboratórios veterinários, entretanto, outras técnicas surgiram, como as de concentração das microfilárias sangüíneas.

As técnicas laboratoriais utilizadas nesta pesquisa consistiram em: exame de sangue a fresco, técnica de Knott modificada e técnica de filtração, para a detecção de microfilárias. Os testes de anticorpos para *Dirofilaria immitis* não foram empregados na pesquisa, pois têm mostrado grande número de reações falso positivas e negativas, para serem considerados úteis como teste de detecção da infecção (HAHN, 1999). Entretanto, os dois testes sorológicos para antígenos de *D. immitis* adulta, que são altamente sensíveis e específicos, estão disponíveis no Brasil e foram utilizados nesta pesquisa.

4.7.1 Exame direto do sangue

Este exame é o mais simples e tem como objetivo a detecção de microfilárias sangüíneas. Pode, também, ser usado para avaliar o padrão de movimentação das microfilárias, critério de diferenciação entre os gêneros *Dirofilaria* sp. e *Dipetalonema* sp.

Este exame foi realizado com as 256 amostras sangüíneas, tendo-se como base as etapas abaixo, descritas por HAHN (1999):

1. Colocar uma gota de sangue, com anticoagulante, em uma lâmina limpa para microscopia.
2. Colocar uma lamínula sobre a gota de sangue.
3. Examinar a área da lamínula em aumento de 10 x ao microscópio óptico.

Observar os movimentos ondulantes das larvas.

Em todos os exames com resultado positivo para este teste, foi observado a motilidade das microfilárias.

4.7.2 Teste de Knott (1939) modificado por Newton e Wright (1956)

O teste de Knott modificado é um método de concentração das microfilárias que envolve a centrifugação do sangue. Este teste tem a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção das larvas.

Este exame foi realizado com as 256 amostras sangüíneas, tendo-se como base as etapas abaixo, descritas por HAHN (1999):

1. Retirar uma amostra de 1 mL de sangue contendo anticoagulante e colocar em um tubo de ensaio com capacidade de 10 mL.
2. Misturar o sangue (1 mL) com 9 mL de uma solução de formalina a 2%. Misturar bem para que as células vermelhas se lisem completamente e facilite a interpretação do teste. Somente as microfilárias serão fixadas com a formalina a 2%. Se for utilizado formalina a 10% (concentração usada para a fixação de tecidos) as células vermelhas também serão fixadas.

3. Centrifugar a mistura a 1.200 rotações por minuto durante cinco minutos. Desprezar o fluido sobrenadante.
4. Adicionar uma a três gotas de azul de metileno 0,1% ao sedimento. Misturar bem.
5. Por meio de uma pipeta Pasteur, transferir o sedimento corado para uma lâmina de microscopia e colocar uma lamínula sobre o conteúdo da lâmina.
6. Examinar ao microscópio, em aumento de 10 x. As microfilárias estarão fixadas em uma posição estendida com o núcleo corado em azul.

O teste de Knott modificado possibilita realizar a micrometria dos parasitos, um critério utilizado para diferenciar as microfilárias encontradas. Portanto, todos os exames com resultado positivo neste teste foram submetidos à mensuração das microfilárias detectadas.

Para medir as microfilárias é necessário um microscópio equipado com uma lente micrométrica inserida na estrutura da ocular do microscópio. Este conjunto, depois de montado, deve ser calibrado contra uma referência conhecida em forma de uma lâmina com escala micrométrica. Cada lente objetiva do microscópio deve ser calibrada individualmente. Portanto, conta-se o número de marcações que o parasito equivale na escala da lente micrométrica. Este valor é, então, multiplicado pelo fator de correção para obter o resultado final em micrometros (BOWMAN, 1999).

Além da mensuração, o teste de Knott modificado permite a realização de estudos de detalhes morfológicos das microfilárias. Assim, as amostras que apresentavam resultado positivo passavam por um estudo morfológico com a finalidade de diferenciar as microfilárias de *D. immitis* das de *D. reconditum*.

Há um teste alternativo ao de Knott modificado, pois fundamenta-se na metodologia de concentração das microfilárias sangüíneas, entretanto baseia-se na filtração do sangue. Este teste, pouco utilizado pelos laboratórios veterinários paranaenses, será descrito no item a seguir.

4.7.3 Teste de filtração

O teste de filtração, assim como o precedente, envolve a lise das células vermelhas e a fixação das microfilárias existentes no sangue. Porém, a concentração das microfilárias ocorre por meio da filtração.

Há *kits* disponíveis comercialmente, nos Estados Unidos da América do Norte, que contêm os aparatos necessários para a realização deste teste. São necessários os seguintes componentes: suporte para os filtros descartáveis, membranas filtro de material plástico (Figura 3), solução de lise e produtos químicos para a coloração.

Este material pode ser importado isoladamente, a solução de hemólise pode ser substituída por formalina a 2% e o corante pode ser o azul de metileno.

O teste de filtração foi realizado com as 256 amostras sangüíneas, tendo-se como base as etapas abaixo, descritas por HAHN (1999):

1. Adicionar 9 mL de formalina a 2% em uma seringa contendo 1 mL de sangue com anticoagulante. Agitar suavemente a mistura;
2. Conectar o canhão da seringa no local apropriado do suporte para o filtro. No interior deste suporte deve estar presente a membrana filtro, devidamente colocada. Os poros desta membrana podem ter 5 μm de diâmetro, entretanto, a membrana filtro utilizada na pesquisa em questão tinha poros de 2 μm , para evitar perda de microfilárias através dos mesmos. Após a conexão, o êmbolo da

seringa deve ser empurrado para que a mistura passe pela membrana filtro e saia por outro orifício;

3. Preencher a mesma seringa com água e pressionar o êmbolo, novamente no suporte do filtro, para lavar os pequenos dejetos remanescentes;
4. Abrir o suporte de filtros e remover a membrana filtro com uma pinça. Colocar o filtro em uma lâmina para microscopia;
5. Adicionar uma gota de azul de metileno 0,1%, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio, com aumento de 10 x.

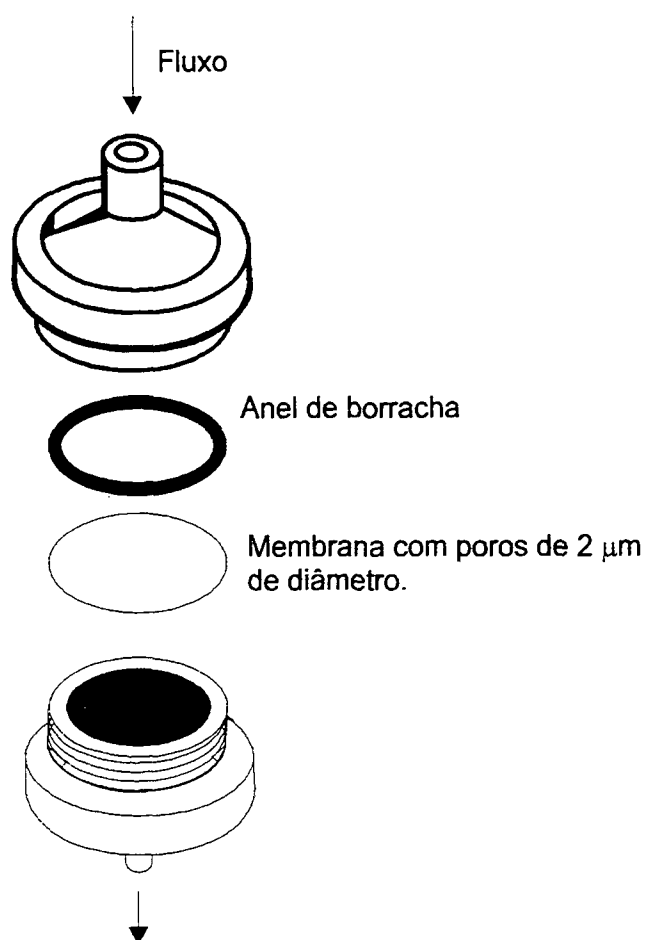


FIGURA 3 – Esquema representando o material (suporte e membrana filtro) para a filtração do sangue, utilizado na pesquisa.

4.7.4 Teste imunológico para a pesquisa de antígeno da *Dirofilaria immitis*

O teste utilizado nesta pesquisa foi o “Witness[®], Synbiotics, San Diego, CA”, um teste antigênico recente. Conforme as informações descritas no folheto explicativo do “Witness[®]”, este teste utiliza anticorpos específicos para detectar o antígeno da *D. immitis* (como o teste ELISA) por meio de imunomigração rápida (*Rapid Immuno Migration, RIM*). A amostra sangüínea contendo antígeno (sangue total, soro ou plasma) entra em contato com partículas de ouro coloidal sensibilizadas. O complexo formado após aquele contato migra sobre uma membrana antes de ser capturado em uma zona reativa. A concentração do complexo na zona reativa, provoca a formação de uma banda cor de rosa visível. Além desta, há uma outra banda controle, situada na extremidade da membrana, que permite assegurar se o teste foi realizado corretamente. A empresa distribuidora Merial afirma que a especificidade deste teste é de 100% e a sensibilidade é de mais de 98% quando o animal tem três ou mais filárias fêmeas adultas. A utilização deste teste seguiu, rigorosamente, as instruções do fabricante, de forma semelhante para cada uma das 256 amostras sangüíneas da pesquisa. Além disso, em todos os testes realizados utilizou-se o sangue total. Quando havia reação com ligeira alteração de cor, o teste era repetido ou o teste Snap[®] era realizado.

Um outro teste imunológico “Snap[®] Canine Heartworm PF, Idexx, Maine, USA” foi utilizado nas amostras positivas ao Witness[®], para confirmação do resultado. Também foi utilizado quando o resultado do teste anterior era duvidoso e nas amostras cujo exame parasitológico indicava microfilárias semelhantes às de *D. immitis*. Em ambas as situações, quando do resultado positivo, o teste também

forneceu o nível da antigenicidade. Este teste Snap® é um ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas (ELISA) para a detecção semiquantitativa do antígeno da *D. immitis* presente no sangue de cães ou de gatos. Para a realização deste teste podem ser utilizados tanto o sangue total quanto o soro ou o plasma.

Para a avaliação da influência dos parâmetros sexo, cor, tipo de pelagem, renda familiar, hábitos noturnos e diurnos sobre a frequência de cães com resultados positivos para dirofilariose, foram realizados testes de análise de variância (ANOVA), considerando-se níveis de significância de 5%.

4.7.5 Exames radiográficos e ultra-sonográficos

Os exames radiográficos e ultra-sonográficos foram realizados em dois animais que apresentaram resultados positivos à pesquisa de antígenos de *D. immitis* pelos testes sorológicos. Tal procedimento ocorreu no Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

5 RESULTADOS

A pesquisa em questão envolveu 256 cães do litoral paranaense. Dentre eles os cães machos estavam presentes em maior número (Tabela 3).

Tabela 3 – Número total de cães (machos e fêmeas) selecionados para a pesquisa realizada no litoral do estado do Paraná.

Número de cães				
TOTAL	Machos	%	Fêmeas	%
256	161	62,89%	95	37,11

As características fenotípicas dos cães da pesquisa foi observada e obteve-se maior presença de cães com pelagem clara e curta (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Caracterização da pelagem dos cães da pesquisa, com relação à cor. Os 256 cães selecionados possuíam pelagem clara, mista ou escura.

Número de cães						
TOTAL	Pelagem clara	%	Pelagem mista	%	Pelagem escura	%
256	129	50,39	46	17,97	81	31,64

Tabela 5 - Caracterização da pelagem dos cães da pesquisa, com relação ao tipo. Os 256 cães selecionados estão classificados em possuírem pelagem curta, média ou longa.

Número de cães						
TOTAL	Pelagem curta	%	Pelagem média	%	Pelagem longa	%
256	181	70,71	37	14,45	38	14,84

A enquête realizada com os proprietários dos cães selecionados forneceu informações com relação à situação financeira dos mesmos e também quanto aos hábitos noturnos e diurnos dos cães (Tabela 6 e 7).

Tabela 6 - Caracterização dos hábitos noturnos e diurnos dos cães da pesquisa. Os 256 cães foram enquadrados em três situações: 24 horas fora de casa; aproximadamente 24 horas dentro de casa ou período noturno dentro de casa.

TOTAL	Número de cães					
	Cães que vivem 24 h fora de casa	%	Cães que vivem aproximadamente 24 h dentro de casa	%	Cães que passam o período noturno dentro de casa	%
256	231	90,23	7	2,73	18	7,03

Tabela 7- Estimativa da renda mensal das famílias dos cães da pesquisa. As famílias dos 256 cães selecionados enquadram-se em possuírem 1 a 3 salários mínimos, 4 a 6, 7 a 9 ou mais de 10 salários mínimos.

TOTAL	Número de famílias							
	renda de 1 a 3 salários mínimos	%	renda de 4 a 6 salários mínimos	%	renda de 7 a 9 salários mínimos	%	renda maior que 10 salários mínimos	%
256	60	23,44	103	40,23	42	16,41	51	19,92

Em seguida, os resultados serão apresentados por metodologia diagnóstica e, posteriormente, serão apresentados os dados segundo a área geográfica.

5.1 Resultados obtidos por meio de diferentes métodos diagnósticos

5.1.1 Anamnese e exame físico

O primeiro exame realizado nos 256 animais selecionados do litoral paranaense, foi o exame físico. Praticamente todos os animais examinados (98,43%) mostraram-se assintomáticos. Foram detectados sinais de alterações orgânicas apenas em quatro animais:

- Cão 107, Pinscher, fêmea, de oito anos de idade, revelou sinais de cardiopatia, entretanto, este cão era amicrofilarêmico e os resultados dos exames subsequentes foram negativos para dirofilariose;
- Cão 111, sem raça definida, macho, de dez anos de idade, revelou dispnéia, membranas mucosas pálidas, condicionamento físico precário (magreza), tosse e cansaço. Apesar do teste imunológico Witness® revelar ausência de antígeno de dirofilária no sangue, os testes detectantes de microfilárias apontaram presença de *D. immitis*, assim como o teste imunológico (Snap®);
- Cão 35, macho, sem raça definida, de cinco anos de idade, apresentou as membranas mucosas pouco pálidas. A proprietária deste cão alegou haver desmaios esporádicos. Os resultados de todos os exames subsequentes foram positivos para dirofilariose;
- Cão 236, raça Fila Brasileiro, fêmea, de oito anos de idade, demonstrou sinais de doença respiratória, pobre condicionamento físico, cansaço, apatia e palidez das membranas mucosas. Foi confirmado dirofilariose pelo teste imunológico.

5.1.2 Exame direto do sangue a fresco

O exame direto do sangue a fresco, realizado em todos os animais selecionados (256 cães) do litoral paranaense, detectou 31 animais com microfilárias sangüíneas, sendo que os cães machos foram os mais parasitados (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Número de amostras sangüíneas positivas ao exame direto com relação ao número total de amostras sangüíneas examinadas.

Número de amostras sangüíneas		
TOTAL	Número de amostras sangüíneas com resultado positivo ao exame direto	%
256	31	12,11

Tabela 9 – Número de cães machos e fêmeas (n = 31) que revelaram resultado positivo ao exame direto do sangue.

Número de cães com resultados positivos ao exame direto				
Total	Machos	%	Fêmeas	%
31	24	77,42	7	22,58

O exame direto do sangue possibilitou realizar uma avaliação dos movimentos executados pelas microfilárias detectadas (Tabela 10). Por meio desta metodologia observou-se que 83,87% das amostras sangüíneas apresentaram, exclusivamente, microfilárias dotadas de movimentos serpentiformes. A Figura 4, ilustra, de forma estática, o movimento serpentiforme demonstrado pelas microfilárias detectadas no sangue.

Tabela 10 – Movimentos executados pelas microfilárias detectadas ao exame direto do sangue de 31 amostras.

Número de amostras sangüíneas apresentando microfilárias dotadas de:			
Movimento serpentiforme	%	Movimento serpentiforme e retilíneo	%
26	83,87	5	16,13

Por meio do exame direto do sangue observou-se que as microfilárias podem manter sua motilidade por sete a 12 dias, quando o sangue é armazenado com anticoagulante e sob refrigeração (2 a 4° C). Ao contrário do período de 24 horas relatado por HAHN (1999).

Não houve possibilidade de realizar a contagem de microfilárias sangüíneas pelo método citado por ANGUS (1981) devido à pequena quantidade delas. Neste teste, dilui-se um mL de sangue em 6,6 mL de líquido estromalizante, para contar as microfilárias em câmara de McMaster.

5.1.3 Teste de Knott modificado

O teste de Knott modificado detectou um número maior (71) de cães microfilarêmicos, com relação ao teste direto do sangue a fresco, uma vez que concentra as microfilárias no sangue (Tabela 11). Ao comparar machos e fêmeas, os cães machos estavam parasitados em maior número (Tabela 12).

Tabela 11 – Número de amostras sangüíneas positivas ao teste de Knott modificado com relação ao número total de amostras sangüíneas examinadas.

Número de amostras sangüíneas		
TOTAL	Amostras com resultado positivo ao teste de Knott modificado	%
256	71	27,73

Tabela 12 – Número de cães machos e fêmeas (n = 71) que revelaram resultado positivo ao teste de Knott modificado.

Número de cães com resultados positivos ao teste de Knott modificado				
Total	Machos	%	Fêmeas	%
71	51	71,83	20	28,17

O teste de Knott modificado possibilitou:

- realização da mensuração, do comprimento e da largura das microfilárias detectadas;
- verificação da conformação da extremidade posterior das microfilárias;
- verificação da conformação da extremidade anterior das microfilárias e constatação da presença de gancho nesta extremidade.

De cada amostra sangüínea, com resultado positivo ao teste de Knott, eram medidas dez microfilárias, no mínimo. Destas larvas mensuradas, extraiu-se uma média, que caracteriza o tamanho médio das microfilárias encontradas em cada

amostra (Anexo 2). As microfilárias foram distribuídas em três grupos que estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 – Tamanhos máximo, mínimo e médio dos três grupos de microfilárias obtidos por meio do teste de Knott modificado (n = 71).

Grupos	Número de amostras	%	Comprimento mínimo e máximo das microfilárias (μm)	Comprimento médio das microfilárias (μm)	Diâmetro médio das microfilárias (μm)
1	51	71,83	236,2 – 286,0	258,50 ± 11,32	4,1
2	9	12,67	306,2 – 340,2	328,03 ± 10,56	6,7
3	11	15,50	304,4 – 338,9	323,49 ± 12,73	6,0

O terceiro grupo, apesar de possuir tamanho semelhante ao segundo, foi classificado à parte pois apresentava outras características diferentes e que serão discutidas a seguir.

A conformação da extremidade posterior das microfilárias foi observada nas 71 amostras sangüíneas com resultado positivo ao teste de Knott modificado. O estudo realizado permite dizer que grande parte das amostras sangüíneas apresentaram microfilárias com extremidades posteriores retas e em forma de gancho (Tabela 14).

As microfilárias dotadas de extremidade posterior em forma de gancho foram detectadas em 22,53% das amostras sangüíneas (Figura 5).

As microfilárias dotadas de extremidade posterior reta foram detectadas em 5,63% das amostras sangüíneas (Figura 6).

Nas outras 51 amostras sangüíneas restantes (71,83%) existiam microfilárias com ambas conformações: extremidade posterior reta e em forma de gancho.

Tabela 14 – Conformação da extremidade posterior das microfilárias dos três grupos obtidos por meio do teste de Knott modificado (n = 71).

Grupos	Número de amostras	%	Conformação da extremidade posterior das microfilárias detectadas no teste de Knott modificado
1	16	22,53	Formato de gancho
2	4	5,63	Formato reto
3	51	71,83	Formato de gancho e formato reto

A conformação da extremidade anterior das microfilárias detectadas no teste de Knott modificado também foi observada nas 71 amostras sangüíneas positivas ao teste. A partir do estudo de cada uma das extremidades, foi possível separar as microfilárias em três grupos que estão representados no Tabela 15.

Tabela 15 – Conformação da extremidade anterior das microfilárias dos três grupos obtidos por meio do teste de Knott modificado (n = 71).

Grupos	Número de amostras	%	Conformação da extremidade anterior das microfilárias detectadas no teste de Knott modificado
1	51	71,83	Larga, presença de gancho
2	9	12,67	Afilada, presença de uma pequena fenda
3	11	15,50	Afilada, presença de um pequeno gancho

Em torno de 4560 detalhes morfológicos, morfométricos e de movimentos das microfilárias foram observados e analisados em 710 microfilárias obtidas por meio das metodologias de exame direto do sangue e de Knott modificada. Os dados obtidos por meio do teste direto não permitiram identificar as microfilárias, uma vez que 83,87% das amostras sangüíneas possuíam microfilárias com movimento serpentiforme. Entretanto, os dados obtidos por meio do teste de Knott modificado permitiram classificar as microfilárias em três grupos:

- as características com relação ao tamanho, extremidade posterior e anterior, descritas para o grupo 1 são condizentes com microfilárias de *Dipetalonema reconditum*, presentes em 51 amostras sangüíneas (Figura 5);
- as características com relação ao tamanho, extremidade posterior e anterior, descritas para o grupo 2 são condizentes com microfilárias de *Dirofilaria immitis*, presentes em nove amostras sangüíneas (Figura 6);
- as características com relação somente ao tamanho e extremidade anterior, descritas para o grupo 3 não coincidem como sendo das duas microfilárias citadas acima. Sugere-se a presença de uma terceira microfilária que pertencente à superfamília Filarioidea (Figura 7).

Adicionalmente, por meio do teste de Knott modificado, em três cães detectou-se que havia microfilárias de dois tipos na mesma amostra sangüínea. Portanto, tal fato foi detectado em apenas 1,17% dos cães, dentre os 256 analisados. Uma vez que o número de cães é pequeno e que não foi possível a confirmação da dupla infecção, o diagnóstico foi firmado levando em consideração o tipo de microfilária predominante ao exame. A confirmação da infecção não foi realizada pois os cães possuíam proprietários que não permitiram a realização de eutanásia e necropsia. Somente por meio destes exames seria possível a detecção dos parasitos adultos, confirmando a dupla infecção.

LEGENDAS DAS FIGURAS 4, 5, 6 E 7.

FIGURA 4 - Microfilária detectada ao exame direto do sangue. A figura representa o “movimento serpentiforme” da microfilária, caracterizado em 83,87% das amostras sangüíneas (objetiva de 20 x).

FIGURA 5 – Microfilárias de *Dipetalonema reconditum*, fixadas em formalina a 2% e coradas por azul de metileno. A) caracterização da extremidade anterior larga e dotada de gancho (objetiva de 40 x). B) caracterização da extremidade anterior larga e posterior em forma de gancho (objetiva de 20 x).

FIGURA 6 - Microfilárias de *Dirofilaria immitis*, fixadas em formalina a 2% e coradas por azul de metileno. A) caracterização da extremidade posterior reta e anterior afilada (objetiva de 20 x), B) caracterização da extremidade anterior dotada de espaço cefálico (fenda) (objetiva de 40 x).

FIGURA 7 - Microfilária de parasito pertencente à superfamília Filarioidea, fixada em formalina a 2% e corada por azul de metileno. Caracterização da extremidade anterior afilada e com um pequeno gancho e extremidade posterior reta (objetiva de 30 x).

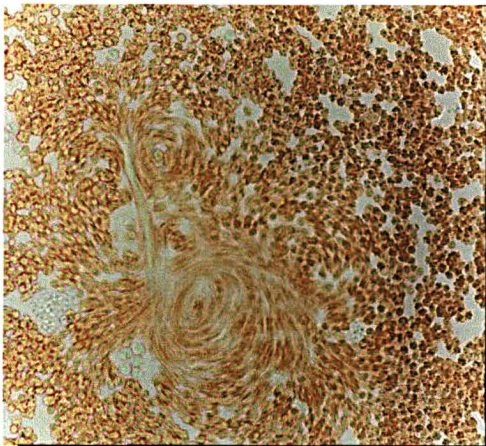


FIGURA 4

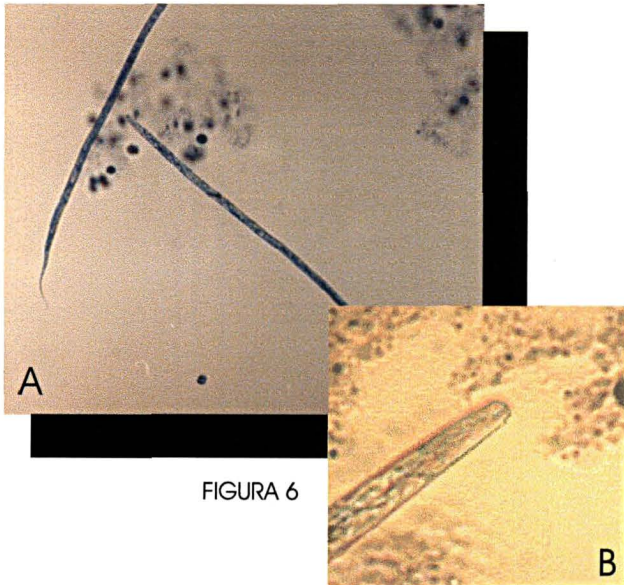
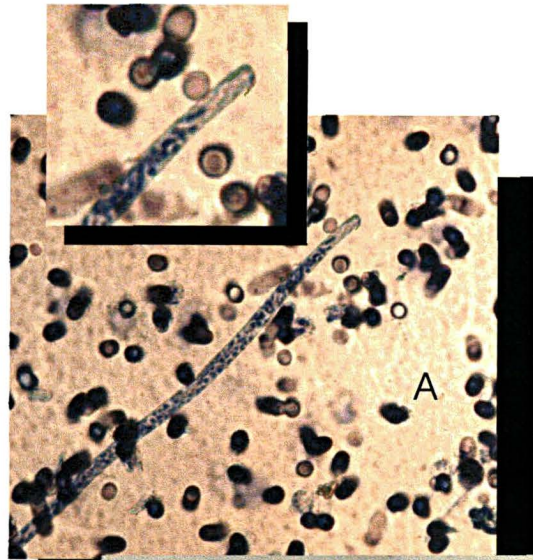


FIGURA 6

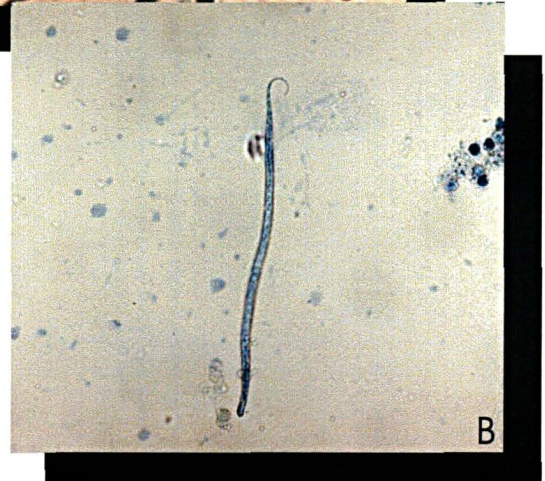


FIGURA 5



FIGURA 7

5.1.4 Teste de Filtração

O teste de filtração, realizado nas amostras sanguíneas dos 256 cães, detectou oitenta amostras com resultado positivo à pesquisa de microfilárias. Dentre elas, 55 eram de cães machos (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16 - Número de amostras sanguíneas examinadas ao teste de filtração do sangue e número de amostras com resultado positivo a este teste.

Número de amostras sanguíneas		
TOTAL	Amostras com resultado positivo ao teste de filtração	%
256	80	31,25

Tabela 17 – Número de cães machos e fêmeas (n = 80) que revelaram resultado positivo ao teste de filtração do sangue.

Número de cães com resultados positivos ao teste de filtração			
Machos	%	Fêmeas	%
55	68,75	25	31,25

O teste de filtração detectou presença de microfilárias em oitenta amostras de sangue. Comparando-se com o teste de Knott modificado, o teste de filtração detectou nove amostras de sangue além das detectadas pelo teste de Knott modificado. A diferenciação das microfilárias, detectadas nas nove amostras adicionais, foi realizada por meio da mensuração e/ou pela avaliação da extremidade anterior das larvas. O resultado da diferenciação das microfilárias permitiu dividi-las nos mesmos três grupos observados pelo teste de Knott modificado:

- Grupo 1: três amostras sanguíneas apresentaram microfilárias com tamanho semelhante ao de *Dipetalonema reconditum* e quatro amostras, além das três

anteriores, apresentaram microfilárias dotadas de gancho na extremidade anterior, semelhante ao de *D. reconditum*;

- Grupo 2: uma amostra sangüínea apresentou microfilárias dotadas de uma fenda na extremidade anterior, semelhante à de *Dirofilaria immitis*;
- Grupo 3: uma amostra sangüínea apresentou microfilárias dotadas de pequeno gancho cefálico e tamanho que se enquadram na superfamília Filarioidea.

Portanto, o teste de Knott modificado e o teste de filtração detectaram e diferenciaram três grupos diferentes de microfilárias. O número de cães que demonstrou microfilárias e o parasito detectado estão explícitos na Tabela 18.

Tabela 18 – Número de cães que apresentou microfilárias de *Dipetalonema reconditum*, *Dirofilaria immitis* ou de outro parasito da superfamília Filarioidea, após a realização dos testes Knott e filtração (n = 80).

	<i>Dipetalonema reconditum</i>		<i>Dirofilaria immitis</i>		Parasito da superfamília Filarioidea	
		%		%		%
Número de cães	58	72,5	10	12,5	12	15,0

5.1.5 Teste imunológico para a pesquisa de antígeno da *Dirofilaria immitis*

O teste imunológico utilizado nas 256 amostras sangüíneas foi o Witness® (Synbiotics). Este teste detectou 12 animais que apresentaram antígenos de *D. immitis* no sangue total. Dos 12 resultados positivos, oito apresentaram uma reação fortemente reativa e quatro apresentaram uma linha rosa muito fraca. A Figura 8 caracteriza resultados positivo e negativo obtidos pelo teste Witness®.

As amostras sangüíneas destes 12 animais também foram analisadas pelo teste Snap® Canine Heartworm PF (IDEXX). Este teste detectou que os mesmos 12 animais apresentaram resultado positivo na pesquisa de antígenos de *D. immitis*. Houve, ainda, duas amostras sangüíneas que, apesar de mostrarem-se como negativas à pesquisa de antígenos pelo teste Witness®, apresentaram um número grande de microfilárias e semelhantes às de *D. immitis*. Nestes dois casos, o teste Snap® foi realizado e acusou resultados positivos (Tabela 19). A Figura 9 caracteriza resultado negativo pelo teste Witness® e positivo pelo Snap®. Este último, por ser um teste quantitativo, indicou que todos os 14 animais que apresentaram resultado positivo, possuem uma antigenemia em baixo nível.

Tabela 19 - Número de cães com resultados positivos aos testes imunológicos Witness® e Snap®.

Número total de cães da pesquisa	Número de cães com resultados positivos ao teste imunológico			
	Witness®	%	Snap®	%
256	12	4,68	14	5,47

Dentre os 14 cães com presença de antígeno de *D. immitis* no sangue, houve maior prevalência de cães machos, com pelagem clara e escura e com idade entre dois e quatro anos (Tabelas 21, 22, 23 e 24). Além disso, havia 28,6% de cães amicrofilarêmicos (Tabela 20).

Tabela 20 - Número de animais amicrofilarêmicos que apresentaram antígeno de *Dirofilaria immitis* ao teste imunológico (Snap®).

Número de cães com resultados positivos ao teste imunológico		
TOTAL	Cães amicrofilarêmicos	%
14	4	28,57

Tabela 21 - Número de cães machos e fêmeas que apresentaram antígeno de *Dirofilaria immitis* ao teste imunológico (n = 14).

Número de cães com resultados positivos ao teste imunológico				
TOTAL	Machos	%	Fêmeas	%
14	9	64,29	5	35,71

Tabela 22 - Número de animais, dispostos em três faixas etárias, que apresentaram antígeno de *Dirofilaria immitis* ao teste imunológico (n = 14).

Idade e número de cães com presença de antígenos de <i>D. immitis</i> ao teste imunológico					
Idade entre 2 e 4 anos	%	Idade entre 5 e 7 anos	%	Idade entre 8 e 10 anos	%
6	42,86	4	28,57	4	28,57

Tabela 23 – Características da pelagem dos cães que apresentaram antígeno de *Dirofilaria immitis* ao teste imunológico (n = 14).

Número de cães com presença de antígenos de <i>D. immitis</i> ao teste imunológico					
Pelagem clara	%	Pelagem mista	%	Pelagem escura	%
7	50,0	1	7,14	6	42,86

Tabela 24 – Características da pelagem dos cães que apresentaram antígeno de *Dirofilaria immitis* ao teste imunológico (n = 14).

Número de cães com presença de antígenos de <i>D. immitis</i> ao teste imunológico					
Pelagem curta	%	Pelagem intermediária	%	Pelagem longa	%
10	71,43	2	14,28	2	14,28

A comparação do número de cães machos e de fêmeas foi realizada com relação ao parasito detectado por meio dos testes parasitológicos e/ou imunológicos. A observação dos resultados indica que não houve preferência entre o tipo de parasito detectado com relação ao sexo dos cães (Tabelas 25 e 26).

Tabela 25 – Comparação entre o número total de cães fêmeas selecionadas para a pesquisa, número de fêmeas não infectadas e número de fêmeas infectadas por *Dipetalonema reconditum*, *Dirofilaria immitis* ou por outro parasito da superfamília Filarioidea.

Total	Número de cães fêmeas							
	Não infectadas	%	Presença de <i>D. reconditum</i>	%	Presença de <i>D. immitis</i>	%	Presença de outro parasito Filarioidea	%
95	69	72,63	17	17,98	5	5,26	4	4,21

Tabela 26 – Comparação entre o número total de cães machos selecionados para a pesquisa, número de machos não infectados e número de machos infectados por *Dipetalonema reconditum*, *Dirofilaria immitis* ou por outro parasito da superfamília Filarioidea.

Total	Número de cães machos							
	Não infectados	%	Presença de <i>D. reconditum</i>	%	Presença de <i>D. immitis</i>	%	Presença de outro parasito Filarioidea	%
161	103	63,97	41	25,46	9	5,59	8	4,96

5.1.6 Exames radiográficos e ultra-sonográficos

Os exames radiográficos e ultra-sonográficos, realizados em dois animais que apresentaram antígenos de *Dirofilaria immitis* detectados ao teste imunológico (cão 1, microfilarêmico e sintomático e cão 2, amicrofilarêmico e assintomático) revelaram sinais característicos de dirofilariose. As imagens radiográficas e ultra-sonográficas do cão 2 são mais sutis (Figuras 10 e 11).

LEGENDAS DAS FIGURAS 8, 9, 10 E 11.

FIGURA 8 – Testes Witness[®] realizados com duas amostras sangüíneas diferentes.

A) demonstra resultado positivo, caracterizado pela primeira linha rosa. A segunda linha rosa representa o controle positivo; B) teste demonstra resultado negativo.

FIGURA 9 – Testes Witness[®] e Snap[®] realizados com amostras sangüíneas provenientes do mesmo cão. A) teste witness demonstra resultado negativo; B) teste Snap[®] demonstra resultado positivo, com pequena concentração antigênica, caracterizada pela presença de uma marca azul. A marca azul inferior representa o controle positivo.

FIGURA 10 – Imagens radiográficas de dois cães positivos à pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis* no sangue. A) radiografia torácica, projeção ventrodorsal, do cão número 1, microfilarêmico e sintomático. As alterações envolvem aumento ventricular direito; tortuosidade e maior radiopacidade das artérias pulmonares lobares caudais e proeminência da artéria pulmonar principal. B) radiografia torácica ventrodorsal do cão número 2, amicrofilarêmico e assintomático. As estruturas alteradas são as mesmas do cão 1, entretanto, no cão 2 elas são sutis.

FIGURA 11 – Imagens ultra-sonográficas do coração de dois cães positivos à pesquisa de antígenos de *Dirofilaria immitis* no sangue. A) imagem cardíaca em corte longitudinal do coração do cão número 1, microfilarêmico e sintomático, demonstrando aumento do ventrículo direito, e a presença de pequenos focos hiperecóticos próximos à parede ventricular. B) imagem cardíaca em corte transversal do cão número 2, amicrofilarêmico e assintomático, demonstrando o aumento ventricular direito.

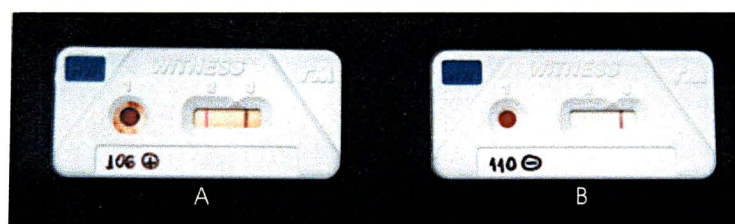


FIGURA 8

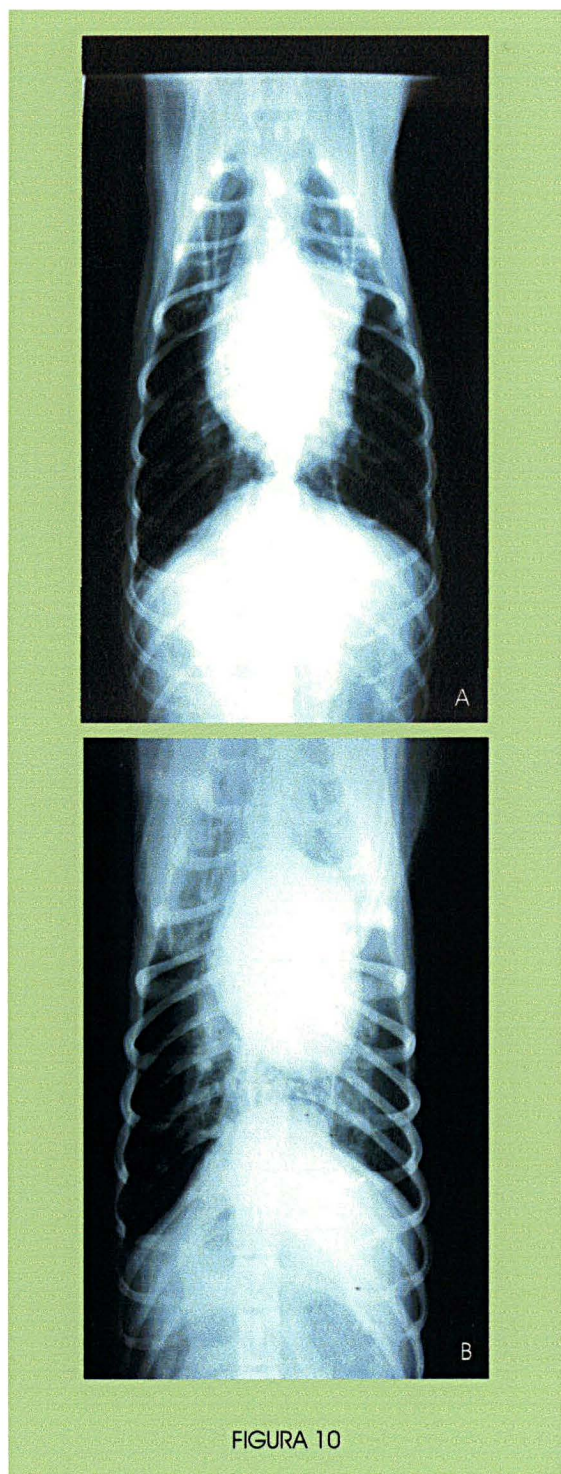


FIGURA 10

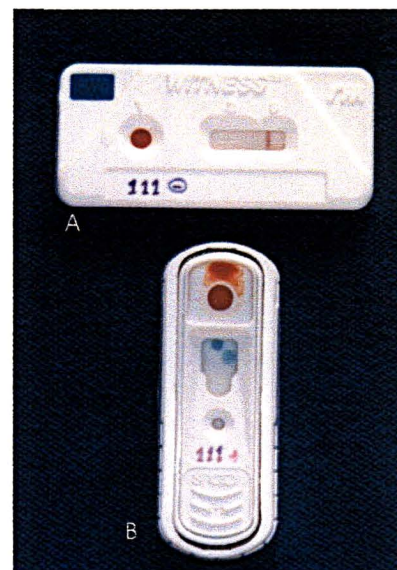
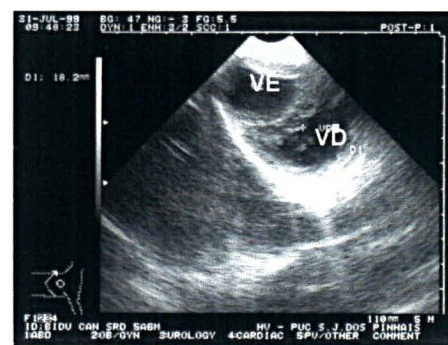


FIGURA 9



A



B

FIGURA 11

5.1.7 Resultados gerais envolvendo os dados obtidos por meio das metodologias diagnósticas empregadas na pesquisa

Os resultados comparativos finais, incluindo a pesquisa de microfilárias no sangue pelos métodos: exame direto, teste de Knott modificado e teste de filtração, revelam que o teste de filtração detectou um maior número de amostras com microfilárias sangüíneas (Figura 12).

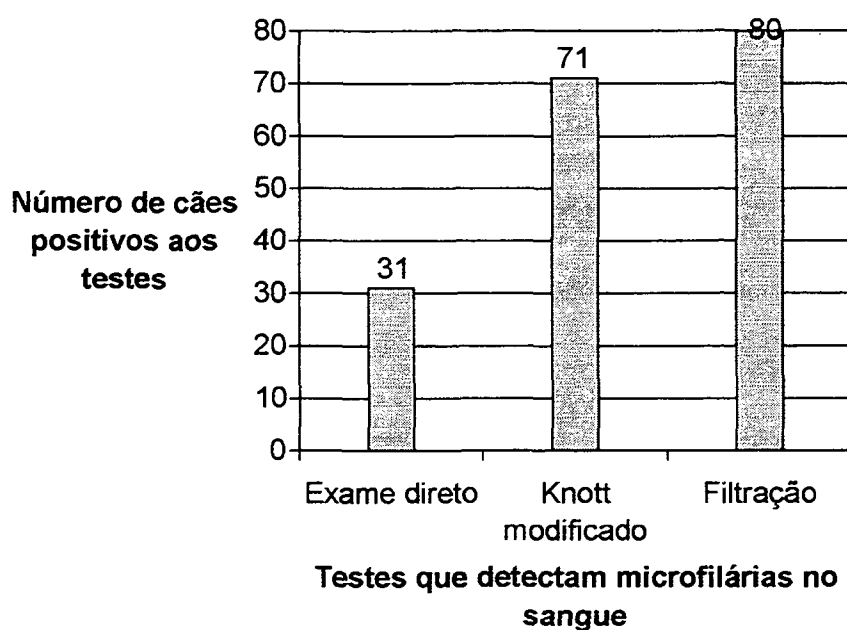


FIGURA 12 – Número de cães com resultados positivos aos testes que detectam microfilárias no sangue. Os resultados são totais, incluindo as três diferentes microfilárias detectadas.

Comparando-se a eficácia dos testes em detectar infecção por *Dirofilaria immitis*, os testes imunológicos revelaram resultados positivos, para presença de antígenos de *D. immitis* no sangue, em uma maior quantidade de cães (Figura 13).

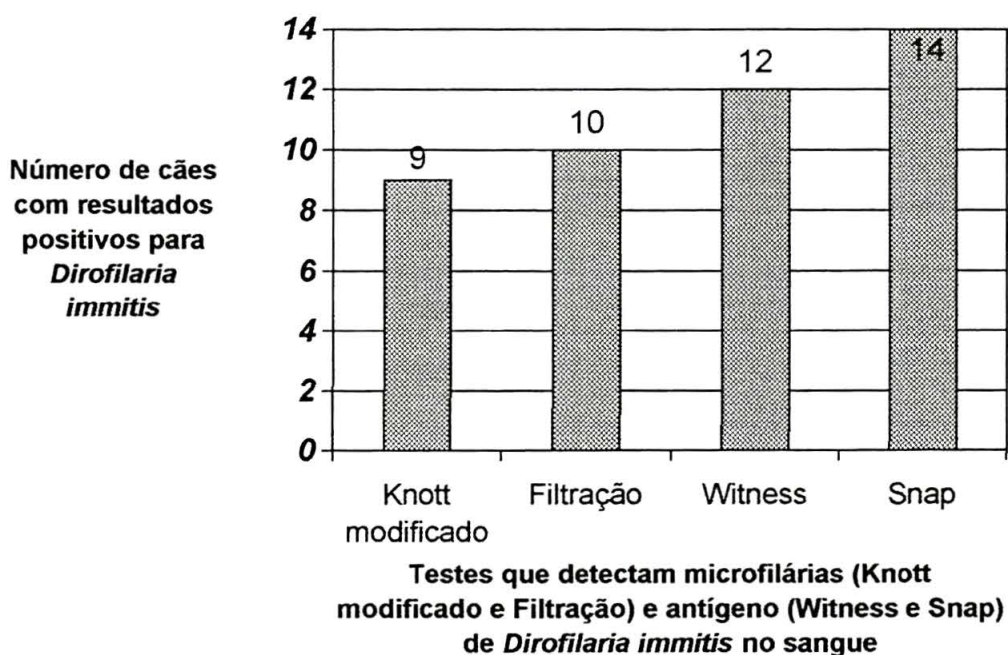


FIGURA 13 – Comparação do número de cães com resultados positivos aos testes que detectam microfilárias de *Dirofilaria immitis* com relação ao número de cães positivos aos testes imunológicos, para a presença de antígenos de *Dirofilaria immitis*.

As amostras de sangue, dos 256 animais selecionados do litoral paranaense, foram analisadas para a pesquisa de filarídeos e 84 delas mostraram infecção por um dos três parasitos detectados. As microfilárias de *D. reconditum* estavam presentes em 58 cães e o restante dos cães apresentaram infecção por outros dois filarídeos (Figura 14).

A temperatura média local, no dia da colheita de sangue dos cães, foi comparada com o número de cães detectados com microfilárias no sangue. Observou-se pequeno aumento do número de cães parasitados por filarídeos durante o verão (Figura 15).

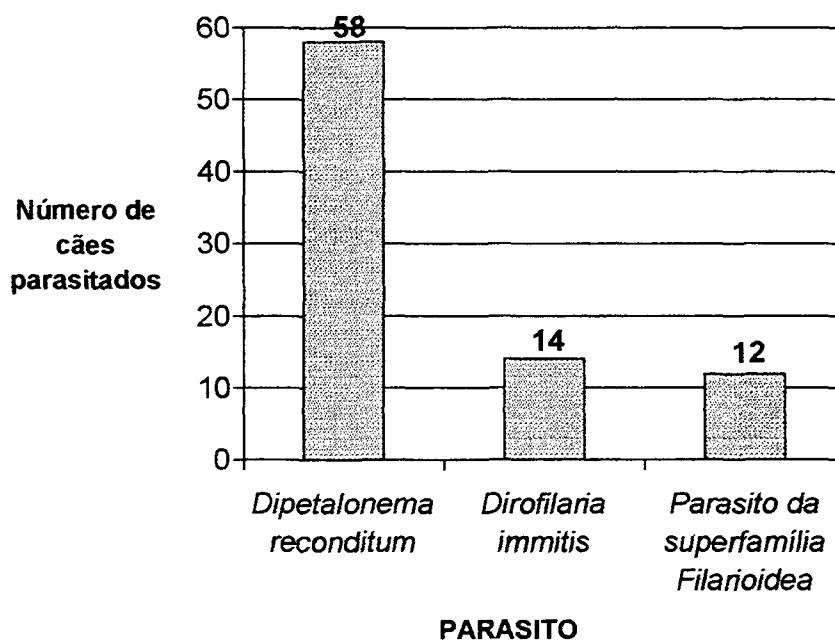


FIGURA 14 – Relação do número de cães infectados e os respectivos filarídeos detectados (*Dipetalonema reconditum*, *Dirofilaria immitis* e outro parasito da superfamília Filarioidea).

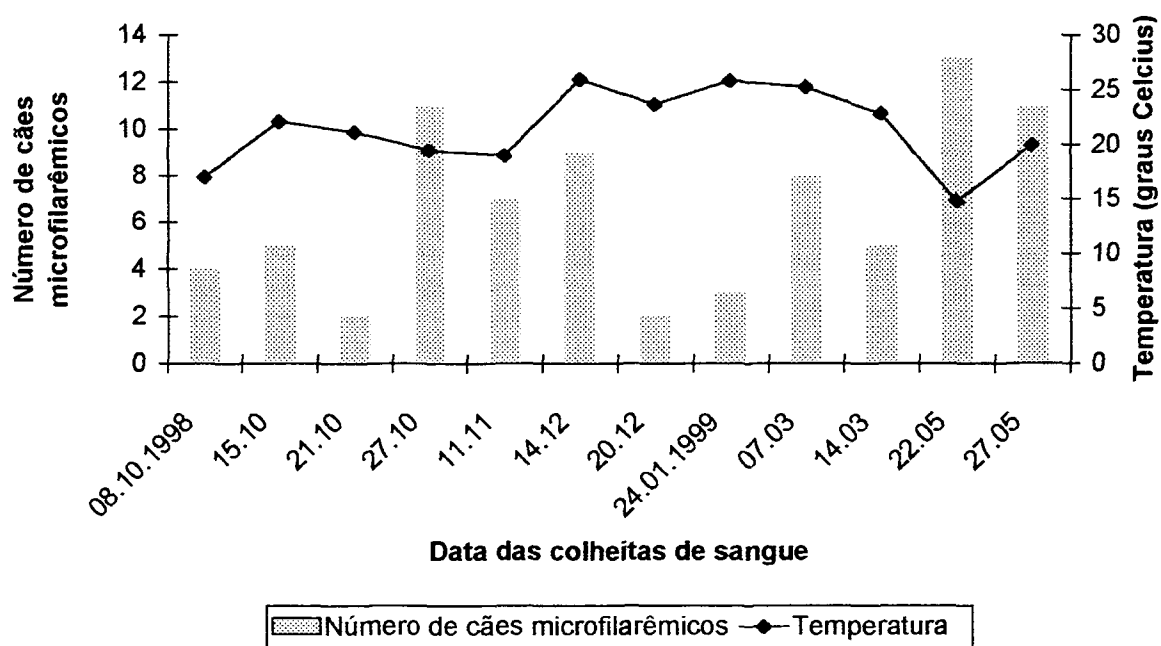


FIGURA 15 – Correlação entre a temperatura média diária e o número de cães microfilariêmicos detectados em cada dia da colheita de sangue.

5.2 Resultados obtidos por área de estudo

Os 256 animais da pesquisa estão distribuídos em grupos pertencentes a 11 principais regiões do litoral Paranaense, que envolvem: Morretes, Pontal do Sul, Shangrilá, Ipanema, Praia de Leste, Ilha do Mel, Guaratuba, Matinhos, Antonina, Guaraqueçaba e Ilha Peças.

O número de cães variou entre as regiões, sendo que houve uma maior quantidade de cães machos selecionados, com exceção de Shangrilá, onde a distribuição de machos e de fêmeas foi equilibrada (Tabela 27).

Tabela 27 – Número total de cães, número de cães machos e de fêmeas, estudados em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense.

Regiões do litoral paranaense	Total de cães	Machos	%	Fêmeas	%
Morretes	30	21	70,00	9	30,00
Pontal do Sul	21	11	52,38	10	47,52
Shangrilá	12	6	50,00	6	50,00
Ipanema	18	10	55,55	8	44,44
Praia de Leste	16	11	68,75	5	31,25
Guaratuba	49	31	63,27	18	36,73
Ilha do Mel	26	17	65,38	9	34,62
Matinhos	22	13	59,09	9	40,91
Antonina	13	9	69,23	4	30,77
Guaraqueçaba	29	19	65,52	10	34,48
Ilha das Peças	20	13	65,00	7	35,00
TOTAL	256	161	62,89	95	37,11

A pesquisa de microfilárias no sangue dos cães do litoral paranaense revelou que as regiões: Guaraqueçaba, Ilha das Peças, Guaratuba e Praia de Leste apresentaram o maior número de cães com microfilárias sanguíneas (Tabela 28). Na pesquisa de *D. immitis* no sangue dos cães, as regiões: Guaraqueçaba e Ilha das Peças revelaram ter maior porcentagem de cães infectados por *D. immitis*. Neste caso, o teste de filtração foi comparado com os imunológicos (Tabela 29).

Tabela 28 – Número de amostras com resultados positivos aos exames que detectam microfilárias sanguíneas (exame direto, teste de Knott modificado, teste de filtração) detectadas em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense (n = 256).

Regiões do litoral paranaense	(n)	Amostras com resultados positivos					
		Exame direto	Teste de Knott modificado		Teste de filtração		
		(n)	%	(n)	%	(n)	%
Morretes	30	4	13,33	8	26,67	9	30,00
Pontal do Sul	21	3	14,28	4	19,05	5	23,81
Shangrilá	12	1	8,33	1	8,33	1	8,33
Ipanema	18	0	0	1	5,55	2	11,11
Praia de Leste	16	3	18,75	6	37,50	6	37,50
Guaratuba	49	8	16,33	19	38,77	20	40,81
Ilha do Mel	26	1	3,85	7	26,92	7	26,92
Matinhos	22	3	13,64	3	13,64	3	13,64
Antonina	13	1	7,69	2	15,38	3	23,07
Guaraqueçaba	29	6	20,69	12	41,38	13	44,83
Ilha das Peças	20	1	5,00	8	40,00	11	55,00
TOTAL	256	31	12,11	71	27,73	80	31,25

Tabela 29 – Número de amostras com resultados positivos para *Dirofilaria immitis* (presença de microfilárias ao teste de filtração ou de antígeno de *Dirofilaria immitis* aos testes imunológicos) detectadas em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense (n = 256).

Regiões do litoral paranaense	(n)	Amostras com resultados positivos para D. immitis					
		Teste de filtração	Teste Witness®		Teste Snap®		
		(n)	%	(n)	%	(n)	%
Morretes	30	0	0	0	0	-*	-
Pontal do Sul	21	1	4,76	1	4,76	1	4,76
Shangrilá	12	1	8,33	1	8,33	1	8,33
Ipanema	18	0	0	0	0	-*	-
Praia de Leste	16	0	0	0	0	-*	-
Guaratuba	49	2	4,08	1	2,04	3	6,12
Ilha do Mel	26	0	0	0	0	-*	-
Matinhos	22	0	0	0	0	-*	-
Antonina	13	0	0	0	0	-*	-
Guaraqueçaba	29	4	13,79	6	20,69	6	20,69
Ilha das Peças	20	2	10,00	3	15,00	3	15,00
TOTAL	256	80	31,25	12	4,69	14	5,47

NOTA: *Teste Snap® não foi realizado nos cães destas regiões.

Os exames parasitológicos e imunológicos do sangue permitiram determinar a prevalência das filárias *D. immitis*, *D. reconditum* e do terceiro filarídeo, de acordo com a região geográfica pesquisada (Figura 16).

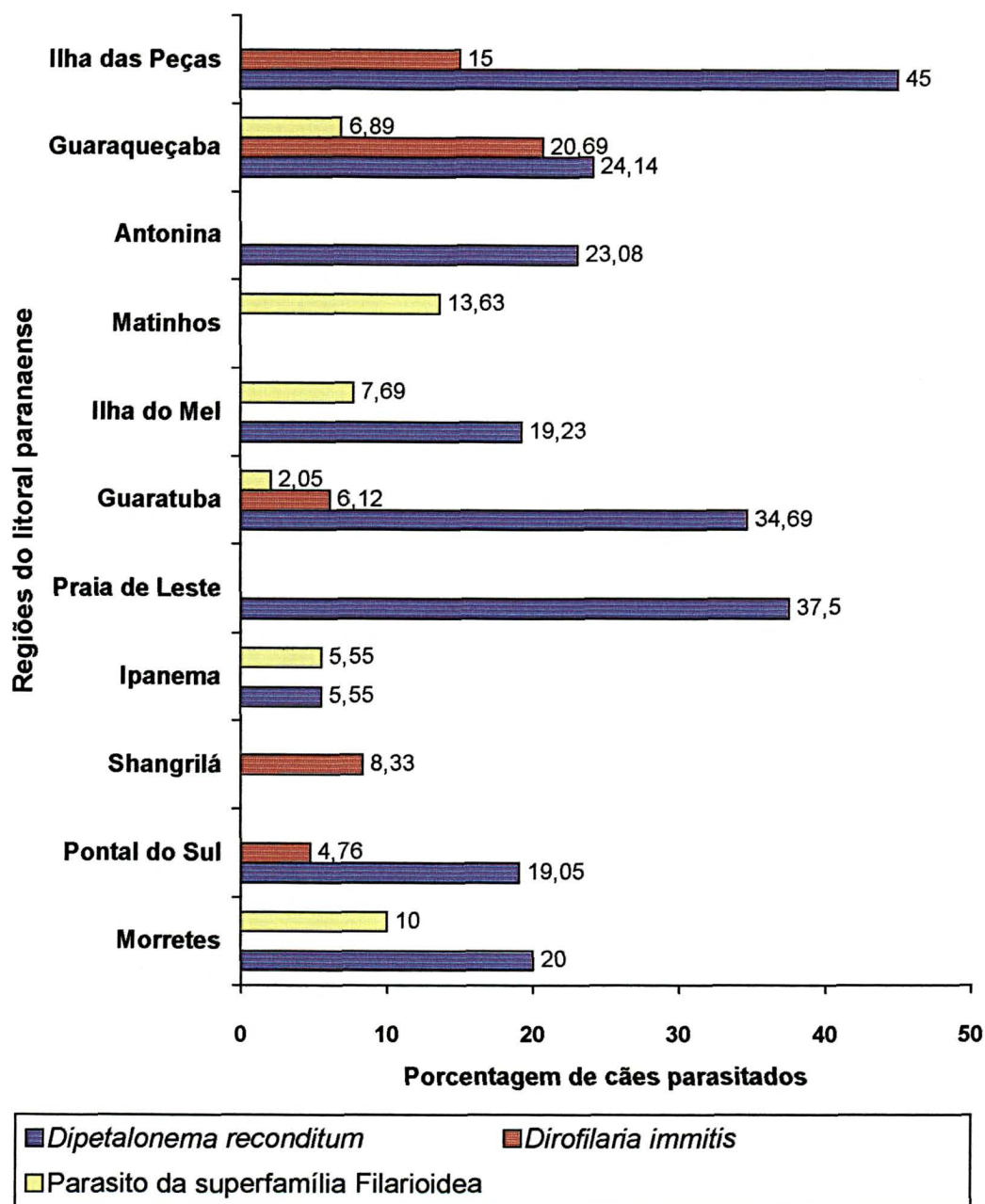


FIGURA 16 – Relação dos filarídeos encontrados na pesquisa, após realização dos testes parasitológicos e imunológicos, e a porcentagem de cães infectados em cada uma das 11 regiões do litoral paranaense.

6 DISCUSSÃO

6.1 Eficiência das diferentes metodologias utilizadas

6.1.1 Anamnese E Exame Físico Dos Animais

Durante a presente pesquisa, constatou-se que o exame físico dos animais do litoral paranaense não é útil em acrescentar informações para o diagnóstico de dirofilariose. Isto porque 78,57% dos animais com resultados positivos para dirofilariose são assintomáticos.

Com relação às informações obtidas por meio da anamnese, não foi possível correlacionar a prevalência de dirofilariose pela raça ou pelo porte do animal, uma vez que 76,17% dos 256 animais selecionados não possui uma raça definida e apresenta um tamanho médio, aparentemente padrão. Dos 14 cães diagnosticados como positivos ao teste imunológico, todos são de raça indefinida, a única exceção ocorre com uma fêmea, da raça Fila Brasileira. Com relação à exposição aos mosquitos, também não foi possível correlacionar se há maior ocorrência da doença em cães que dormem fora de casa, uma vez que 90,23% do total de animais pesquisados não dorme dentro de qualquer tipo de instalação. Nesta pesquisa, 92,86% dos animais positivos para dirofilariose permanece fora de casa de forma constante. Quando se trata de uma região endêmica, NELSON & COUTO (1998) afirmam que o porte dos animais deve ser observado, porque, normalmente, os cães de raças grandes permanecem fora de casa e, por isso, têm maior risco de se infectarem do que os de raças pequenas, alojados no interior das casas. Estes mesmos autores citam que não há diferença quando se avalia a raça ou a idade, mas com relação ao sexo, cães machos são acometidos quatro vezes mais que as

fêmeas. No presente trabalho, dentre os animais com dirofilariose, 42,86% têm entre dois a quatro anos. Com relação ao número de machos e fêmeas, 9 (5,59%) dos 161 cães machos e 5 (5,26%) das 95 fêmeas demonstraram antígeno de *D. immitis* no sangue. Esta comparação denota que as frequências são praticamente iguais, mesmo ciente que o universo de machos selecionados tenha sido maior. Em São Paulo ROCHA, TARRAGA & FERREIRA (1997a) detectaram 12% de animais positivos, usando como método diagnóstico o teste sorológico, sendo que os machos apresentaram 1,95 vezes mais chance de estarem infectados do que as fêmeas e a faixa etária com a maior probabilidade da doença foi a de seis a oito anos. Ainda em São Paulo ao estudar a ocorrência de dirofilariose em cães da raça Dogue Alemão, ROCHA, TARRAGA & FERREIRA (1997b) observaram que os cães de pelagem clara foram os mais acometidos em relação aos outros. Na pesquisa em questão observou-se que dentre os 129 cães de pelagem clara selecionados, 5,43% estavam com dirofilariose; dos 81 cães com pelagem escura, 7,41% estavam infectados e 2,17% dos cães com pelagem mista estavam com dirofilariose. Neste caso, não houve preferência por coloração da pelagem ($F=0,809$; $p=0,384$). Com relação ao comprimento dos pêlos, também não houve preferência, pois, aproximadamente, 5% dos cães dotados de cada um dos três tipos de pelagem apresentaram dirofilariose. Em termos de condições financeiras, não houve diferença quando comparou-se a renda mensal das famílias dos cães com resultados positivos para dirofilariose ($F=0,091$; $p=0,762$).

Tendo-se por base os resultados obtidos por todos os testes realizados, a comparação geral, realizada entre machos e fêmeas, definiu que:

- Dentre as 95 fêmeas selecionadas para a pesquisa, 69 (72,63%) não estavam infectadas; 17 (17,89%) estavam infectadas por *D. reconditum*; 5 (5,26%) estavam infectadas por *D. immitis* e 4 (4,21%) estavam infectadas pelo terceiro filarídeo da superfamília Filarioidea;
- Dentre os 161 machos selecionados para a pesquisa, 103 (63,97%) não estavam infectados; 41 (25,46%) estavam infectados por *D. reconditum*; 9 (5,59%) estavam infectados por *D. immitis* e 8 (4,96%) estavam infectados pelo terceiro filarídeo, provavelmente da superfamília Filarioidea.

Esta comparação indica que os resultados, tanto para machos quanto para fêmeas, são semelhantes e permite concluir que as frequências para os achados das diferentes microfilárias foram praticamente iguais.

6.1.2 Testes que detectam microfilárias no sangue

O exame direto do sangue a fresco, o teste de Knott modificado e o teste de filtração foram realizados em cada uma das amostras colhidas, com o objetivo detectar microfilárias sangüíneas. A desvantagem destes métodos é que se as microfilárias estão presentes em baixa concentração, por gota de sangue periférico, tais métodos, principalmente o exame direto, perdem a sensibilidade. Os mesmos exames também demonstraram que um número alto de microfilárias pode sugerir infecção por *Dirofilaria immitis*, mas isto não é regra, pois há cães com dirofilariose que demonstram poucas microfilárias no sangue. Estes resultados são semelhantes aos observados por JACKSON & OTTO (1975) que relataram: um número extremamente alto (aproximadamente, 150 mil microfilárias por mL de sangue)

geralmente indica infecção por *D. immitis*. Entretanto, baixa concentração de microfilárias de *D. immitis* (uma por mL de sangue) pode estar presente. Geralmente, nas infecções por *D. reconditum* poucas microfilárias são encontradas (menos que duzentas por mL de sangue). Estes números não constituem valores padronizados, pois outros autores como BOWMAN (1999) citam valores diferentes: cinco a dez microfilárias em uma gota de sangue poderiam indicar *D. immitis*. Estes dados demonstram que o número de microfilárias encontradas no sangue poderia indicar infecção por *D. immitis*, mas a quantidade de microfilárias pode variar muito durante o decorrer dos anos de infecção e entre as regiões.

Dentre os testes utilizados para detectar microfilárias sangüíneas, o exame direto do sangue a fresco foi o mais econômico, rápido e fácil de ser realizado, mas foi menos sensível que os outros métodos. Permite, contudo, a avaliação da motilidade das microfilárias. As microfilárias de *D. immitis* apresentaram movimento serpentiforme e não mostraram movimentos progressivos. As de *D. reconditum* demonstraram um movimento progressivo, em linha reta, mas grande parte delas caracterizaram-se por ter movimento serpentiforme, semelhante ao observado nas microfilárias de dirofilárias. Estes achados são os mesmos observados por JACKSON & OTTO (1975) entretanto, estes autores acrescentam que o movimento retilíneo das microfilárias de *D. reconditum* pode brevemente intercalá-lo com ondulações serpentiformes.

As microfilárias circulantes detectadas devem ser diferenciadas pensando-se na probabilidade de estarem presentes microfilárias de *D. immitis* e de *D. reconditum*. Ambas filárias são muito parecidas e existem em condições simpátricas, em muitos países, inclusive no Brasil (ALMEIDA & VICENTE, 1982). JACKSON & OTTO

(1975) relatam que o *D. reconditum* adulto é muito pequeno, mede aproximadamente 2,5 a 3,7 cm de comprimento e não causa qualquer alteração clínica. O parasito adulto vive no tecido subcutâneo dos hospedeiros e suas microfilárias são encontradas no sangue circulante. Os filarídeos do gênero *Dipetalonema* foram relatados pela primeira vez no Brasil em 1962, dado fornecido por LIMA & COSTA (1972) em Minas Gerais, onde se detectou duas espécies: *D. reconditum* (Grassi, 1890) e *D. grassii* (Noé, 1907). Hoje, o *D. reconditum* já foi assinalado em várias regiões brasileiras como em Recife, Pernambuco, onde atinge 6,9% (40/611) dos cães (ALVES; SILVA; FAUSTINO *et al.* 1999).

As técnicas de Knott modificada e de filtração permitem a realização do exame morfológico e a mensuração das microfilárias. Em específico, a técnica de Knott modificada proporciona melhores condições para tal pesquisa. Com relação ao estudo das extremidades anteriores das microfilárias detectadas em oitenta amostras de sangue (pelo método de Knott modificado e de filtração), pôde-se constatar que:

- Em 58 amostras sangüíneas as microfilárias apresentaram a extremidade anterior larga e dotada de gancho cefálico. Tal gancho era muito semelhante entre todas as microfilárias destas 58 amostras. Estas microfilárias correspondem a *Dipetalonema reconditum*;
- Dez amostras apresentaram microfilárias com a extremidade anterior afilada e dotada de uma pequena fenda. Esta fenda fazia com que aquela extremidade possuísse um pequeno gancho. Estas microfilárias são de *Dirofilaria immitis*;
- Em 12 amostras observou-se uma certa refringência (gancho) na região cefálica das microfilárias, entretanto, não era uma estrutura semelhante à das

microfilárias anteriores. A morfologia das microfilárias deste grupo aproxima-se mais à de *D. immitis*, mas as diferenças morfológicas sugerem ser um outro tipo de microfilária, pertencente à superfamília Filarioidea.

De modo geral, observou-se que as microfilárias de *D. immitis* são maiores, com relação àsquelas de *D. reconditum*, geralmente mais numerosas, providas de corpo e extremidade posterior retos e cabeça afilada. As de *D. reconditum* estão presentes em pequeno número, com corpo encurvado, extremidade posterior em forma de gancho e a extremidade anterior apresenta um gancho cefálico. Estas características estão de acordo com as relatadas por JACKSON & OTTO (1975); CORWIN (1985) e HAHN (1999). SAWYER *et al.* (1965) *appud* JACKSON & OTTO (1975) foram os primeiros a detectar o gancho cefálico no espécime de *D. reconditum* e, assim como ALMEIDA & VICENTE (1982) demonstraram que a detecção desta estrutura, localizada na extremidade anterior das microfilárias, é um método seguro e eficiente para a diferenciação das microfilárias de *D. reconditum* de outras encontradas em cães. Adicionalmente, no presente estudo, foi constatada a presença de uma pequena “fenda” na extremidade anterior das microfilárias de *D. immitis* que, segundo a descrição feita por KOZEK (1971) este aspecto aparece devido à existência de uma estrutura parecida com um lábio e da presença de um pequeno gancho. A base deste pequeno gancho está contínua com a região dorsal da extremidade cefálica. Entre o gancho e a estrutura semelhante a um lábio há uma fenda que KOZEK (1971) denomina de espaço cefálico.

O teste de Knott modificado permitiu a fácil realização do estudo morfológico e das mensurações das microfilárias. Os resultados das mensurações realizadas revelaram haver três grupos de microfilárias. O primeiro grupo, o mais numeroso, é o

grupo de microfilárias que medem $258,50 \pm 11,32 \mu\text{m}$ de comprimento e $4,10 \mu\text{m}$ de diâmetro, possuem o tamanho e os caracteres morfológicos condizentes com microfilárias de *D. reconditum*. O segundo grupo apresentou comprimento de $328,03 \pm 10,56 \mu\text{m}$ por $6,69 \pm 0,08 \mu\text{m}$ de diâmetro e morfologia semelhante à das microfilárias de *D. immitis*. O valor médio das mensurações destes dois primeiros grupos é semelhante ao referido por CORWIN (1985) e HAHN (1999) que classificou *D. reconditum* com $240\text{-}290 \mu\text{m}$ de comprimento por $4\text{-}5 \mu\text{m}$ de diâmetro e *D. immitis* com $290\text{-}340 \mu\text{m}$ de comprimento por $6\text{-}7 \mu\text{m}$ de largura. O último grupo engloba microfilárias com tamanho de $323,49 \pm 12,73 \mu\text{m}$ de comprimento por $5.89 \pm 0.469 \mu\text{m}$ de diâmetro, semelhante à mensuração observada nas microfilárias condizentes com *D. immitis*. Apesar da semelhança no comprimento e da presença em grande concentração no sangue, as microfilárias deste terceiro grupo são pouco mais finas e possuem a extremidade anterior diferenciada. Nesta extremidade há um gancho cefálico mais proeminente e não semelhante ao observado tanto nas microfilárias de *D. immitis* quanto nas de *D. reconditum*. Além da diferenciação morfológica, os dois testes sorológicos acusaram resultados negativos para a pesquisa de antígeno de *D. immitis* no sangue do último grupo. Estes resultados nos levam a levantar a hipótese da existência de um terceiro tipo de microfilária, supondo-se tratar, por exemplo, de *Dirofilaria striata* ou de *Dirofilaria repens*. As larvas de *Dirofilaria striata* medem entre 360 a $385 \mu\text{m}$ de comprimento por $5\text{-}6 \mu\text{m}$ de largura (BLAGBURN, 1994) maiores do que as detectadas no terceiro grupo da pesquisa em questão. A *Dirofilaria repens* está presente no Brasil, Rússia, Europa, Índia e Argentina, tem como hospedeiros o cão e o gato, é transmitida por mosquitos e os parasitos adultos habitam o tecido subcutâneo, assim como o *Dipetalonema reconditum* (ALMEIDA & VICENTE, 1982).

Segundo estes últimos autores, as microfilárias de *D. repens* medem em torno de 290 μm e são detectadas no sangue periférico. PINTO (1944) relata que a *Dirofilaria repens* (Railliet et Henry, 1911) foi observada apenas em São Paulo, em 1937. Sabe-se que, no Brasil foram detectados quatro filarídeos: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Dipetalonema reconditum* e *Dipetalonema grassii*. As microfilárias de *D. immitis* e de *D. reconditum* são comumente detectadas e diferenciadas. As microfilárias de *Dipetalonema grassii*, segundo, ALMEIDA & VICENTE (1982) não são encontradas na circulação e não são detectadas rotineiramente e, se detectadas, são facilmente diferenciadas pelo seu tamanho exorbitante de 570 μm .

Os aspectos morfológicos das larvas obtidas pela técnica de filtração não são tão discerníveis quanto pelo método de Knott. Um dos motivos é que se a leitura da membrana filtro não for realizada imediatamente, a mesma resseca e inutiliza o material. Por possuir poros de 2 μm de diâmetro, a membrana filtro utilizada muitas vezes reteve os restos celulares da hemólise na sua superfície, fato que influenciou na leitura do exame. Além disso, a membrana filtro possui microporos por onde, muitas vezes, a extremidade posterior penetra e dificulta a observação desta extremidade e a mensuração da microfilária. Esta técnica apresenta outro inconveniente que envolve membranas filtro e a necessidade de uma nova membrana para cada teste, representando maior custo. A técnica de filtração tem a vantagem de ser um método rápido e fácil de ser realizado e parece ser mais sensível em detectar microfilárias do que o de Knott modificado. Ela requer também preparo técnico eficaz, para que não ocorra contaminação cruzada via solução que lisa as hemácias ou pelo suporte e seringa mal lavados. Alguns pesquisadores citam que, quando os poros são de 8 μm pode haver perda de algumas microfilárias pela

membrana ou perdas quando da remoção de excesso de fluido da borda da lâmina ou quando a técnica é mal realizada (CALVERT & RAWLINGS, 1983). Durante a realização do teste de Knott modificado também pode haver contaminação cruzada via pipetas Pasteur ou via solução que lisa as hemácias se o técnico for desatento. Ambos os testes Knott modificado e filtração em membrana foram eficientemente sensíveis para detectar microfilárias no sangue. Entretanto, o teste de filtração detectou um número superior de amostras sangüíneas com presença de microfilárias.

No presente trabalho, ao comparar os três testes que detectam microfilárias no sangue, constatou-se que, dentre os 256 animais estudados, o teste direto detectou 31 animais (12,11%) que demonstraram microfilárias no sangue. O teste de Knott modificado detectou 71 animais (27,73%) microfilarêmicos e o teste de filtração detectou 80 animais (31,25%). Com estes dados, pode-se afirmar que o exame direto do sangue foi menos sensível que os testes de Knott modificado e de filtração. O teste de filtração detectou um maior número de amostras sangüíneas como sendo positivas. Esta ordem de sensibilidade entre os testes é a mesma constatada em uma pesquisa envolvendo 165 cães realizada por HOUSE & GLOVER (1974). Estes pesquisadores obtiveram 79,8% de certeza em detectar microfilárias no sangue oferecida pelo teste direto, o teste de Knott modificado proporcionou 89% de certeza e o teste de filtração teve o melhor desempenho, demonstrando 97,5% de eficácia.

Muitas vezes esses testes detectantes de microfilárias falham, pois, além da amicrofilaremia, alguns pesquisadores como LEVINE (1974) e SAWYER (1975a) alegam que a presença de microfilárias no sangue não é constante, devido às flutuações sazonais, diurnas e noturnas. Não se sabe ao certo o motivo para tal

comportamento, mas KUME (1974) sugere a reação do hospedeiro à picada do mosquito, a temperatura ambiente e o estresse sazonal como fatores em influenciar a periodicidade das microfilárias. Neste caso, as microfilárias aparecem em maior número durante os meses de verão e à noite e são menos abundantes durante os meses de inverno. O estudo da ocorrência de dirofilariose no litoral paranaense ocorreu na primavera e no verão, entretanto, o período de colheita das amostras biológicas foi durante parte da manhã e durante a tarde. Este período não é favorável, mas sabe-se que o estudo da microfilaremia realizado por LARSSON; MENG; RECHE JÚNIOR *et al.* (1995) demonstrou haver alteração na densidade das microfilárias, mas elas não deixaram de ser detectadas durante as 24 horas do dia. Se a microfilaremia dos cães do litoral paranaense for equivalente ao relatado por LARSSON; MENG; RECHE JÚNIOR *et al.* (1995) a pesquisa em questão fornece uma porcentagem segura de cães apresentando microfilárias sanguíneas e de cães amicrofilarêmicos. Além disso, serve como fonte base para futuros trabalhos comparativos na área. É interessante ressaltar a existência de animais que apresentam microfilaremia na forma periódica, em que há alternância de momentos com alta concentração e outros com ausência de microfilárias, como demonstrado por WALTERS (1995). Tendo conhecimento deste último fator, pode-se sugerir que, apesar de segura, a porcentagem de cães microfilarêmicos e amicrofilarêmicos revelada neste trabalho não é 100% exata.

6.1.3 Testes Imunológicos

Dentre os cães diagnosticados como positivos para presença de antígenos de dirofilária no teste sorológico, os resultados dos testes detectantes de microfilárias revelaram a existência de 28,6% de cães amicrofilarêmicos. Este valor parece alto, mas em Recife, Pernambuco, detectou-se 57,1% de cães com sorologia e pesquisa de microfilárias negativos. LEVINE (1974); CALVERT & RAWLINGS (1983) relataram que realmente pode haver cinco a 25% ou mais de cães com a infecção oculta e sugerem que as discrepâncias na quantidade de cães amicrofilarêmicos geralmente ocorrem devido às diferenças geográficas entre as regiões. Vários trabalhos demonstraram que a resposta imune do hospedeiro contra as microfilárias é a principal causa da diminuição ou da ausência de microfilárias sanguíneas (NELSON & COUTO, 1998). Outras causas de infecção oculta podem incluir infecções por filárias de um único sexo, presença de somente parasitos imaturos (infecção prepatente) ou presença de dirofilárias estéreis (CORWIN, 1983). Um fato que pode estar interferindo nos resultados é o uso das lactonas macrocíclicas para outros fins, principalmente a ivermectina, utilizada no tratamento de ectoparasitos, no litoral paranaense. Esta droga, e também a milbemicina oxima, reduzem e eliminam a microfilaremia por danificarem a função reprodutiva das fêmeas e, possivelmente, dos machos de *Dirofilaria immitis*, fato comprovado por KNIGHT (1983).

A amicrofilaremia invalida todos os testes destinados a detectar microfilárias, portanto, o emprego de um teste imunológico é de extrema importância. Principalmente quando a região tem um número alto de infecções ocultas. O teste sorológico, detectante de antígeno da *D. immitis*, foi utilizado na pesquisa como um

método primário na detecção de dirofilariose, assim como recomenda a “American Heartworm Society”.

O teste sorológico utilizado nesta pesquisa foi o Witness[®] que se baseia em uma técnica de imunomigração rápida. Assim como os testes ELISA, usa anticorpos dirigidos contra os fragmentos solúveis - da porção reprodutiva - da *D. immitis* fêmea. O período de tempo mais curto em que a antigenemia e as microfilárias sangüíneas podem ser detectadas é de, aproximadamente, seis meses e meio após a infecção. McTIER; McCALL, SUPAKORNDEJ *et al.* (1995) acrescentam que a antigenemia pode preceder a microfílaemia, mas normalmente só aparece em algumas semanas após a produção de microfilárias.

Apesar da idade mínima para realização do teste antigênico ser de sete meses, os cães da pesquisa foram selecionados para terem no mínimo um ano de idade. Este critério foi adotado para não subestimar a doença na região.

A maioria dos testes sorológicos disponíveis têm a vantagem de caracterizar corretamente animais não doentes (isto é, não há possibilidade de resultado falso positivo), se aparecer falso positivo é porque poderia ter ocorrido erro técnico. Portanto, os testes devem ser realizados seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Os testes que demonstram resultado fraco positivo devem ser repetidos após um intervalo de tempo e, se ainda ambíguo, a confirmação por outro teste antigênico que tenha maior sensibilidade ou radiografias torácicas, poderiam ser realizados. Por outro lado, se houver suspeita de resultado falso negativo, o profissional deve estar ciente de que o mesmo pode ocorrer quando: a infecção é leve, os parasitos fêmeas ainda estão imaturos, somente parasitos machos estão presentes ou quando o teste não foi armazenado adequadamente. Adicionalmente,

observou-se que no teste imunológico utilizado não houve reação cruzada com *Dipetalonema reconditum*. Estas observações surgiram durante a realização da pesquisa em questão e são, praticamente as mesmas relatadas recentemente por McTIER; McCALL; SUPAKORNDEJ *et al.* (1995). Estes últimos autores insinuam a provável ocorrência de reação cruzada com a *Dirofilaria repens*, mas que a infecção por esta filária é a mais rara na maioria dos países.

Entre todos os testes realizados nesta pesquisa, o imunológico demonstrou ser o melhor em termos de sensibilidade, especificidade e facilidade de uso. Dentre os imunológicos utilizados, o teste Snap®, particularmente, foi o mais eficaz. Enquanto os testes de Knott modificado e de filtração detectaram, respectivamente, nove e dez (3,5 e 3,9%) cães com microfilárias de *D. immitis* o teste Witness® e o Snap®, detectaram, respectivamente, 12 e 14 (4,7 e 5,5%) animais com presença de antígeno de *D. immitis* no sangue. Estas características fazem do teste imunológico uma metodologia primária no diagnóstico de dirofilariose, sendo que os testes parasitológicos confirmam o diagnóstico, em casos microfilarêmicos.

A sequência citada acima, da utilização inicial dos testes ELISA e, secundariamente, dos detectantes de microfilárias, deveria ser adotada como rotina nas clínicas das regiões com alta prevalência de dirofilariose. Portanto, no litoral paranaense, que tem uma prevalência baixa da doença, não há necessidade de utilizar o teste sorológico como rotina. O que ocorre, não só no litoral, mas também em Curitiba, capital do estado, é que alguns Médicos Veterinários suspeitam da doença somente quando os sinais clínicos e as alterações radiográficas estão severos. Além disso, os veterinários esquecem que, apesar de ser remota, há a possibilidade de um cão se infectar quando o mesmo passou um certo tempo no

litoral paranaense. A probabilidade de adquirir a infecção aumenta quando os animais vão a um local de alta endemicidade como em regiões litorâneas de São Paulo e do Rio de Janeiro. Pensando nos diagnósticos tardios o presente trabalho pretende mostrar que realmente há dirofilariose no litoral do estado e ressalta a importância da anamnese e da verificação do histórico dos pacientes para que se antecipe a suspeita de dirofilariose. No caso de se optar pelo exame parasitológico de sangue, como primeiro método diagnóstico, deve-se diferenciar as microfilárias detectadas, uma vez que no presente trabalho detectou-se 22,6% de cães demonstrando microfilárias de *D. reconditum*.

Como conclusão sobre os testes sorológicos diz-se que eles podem ser utilizados com confiança em uma variedade de ocasiões como na triagem de animais clinicamente sadios e para a realização de diagnóstico diferencial de dirofilariose, em cães com sinais físicos de doença severa.

Após a realização do trabalho em questão, verificou-se que o litoral paranaense apresenta uma baixa ocorrência de dirofilariose, pois entre os 256 animais estudados apenas 14 apresentaram presença de antígeno de *D. immitis* no sangue, correspondendo a um valor de 5,5%. Este valor é baixo quando comparado com outros estados do Brasil, como 12% em São Paulo por ROCHA; TARRAGA & FERREIRA (1997a). Com relação aos diversos estados brasileiros, os relatos sobre a distribuição da doença são notadamente de regiões costeiras nos seguintes estados: 1,1% no Rio Grande do Sul; 12% em Santa Catarina; 21,3% (124/581) no Rio de Janeiro; 12,5% em Alagoas; 12,4% na Paraíba e 8,8% no Pará (LABARTHE, 1997). Em setembro de 1999, ALVES; SILVA; FAUSTINO *et al.* (1999) detectaram 2,3% (14/611) de cães com dirofilariose em Recife, Pernambuco,

Há dados afirmando que a doença não é exclusivamente litorânea, como por exemplo a cidade de Cuiabá, MT, apresenta 9,62% dos cães parasitados e em Uberlândia, MG, já foram relatados quatro casos. O estado de São Paulo, além de apresentar altas prevalências nas regiões costeiras (Bertioga 45%, Guarujá 14,2% e Riviera de São Lourenço com 18%) também há valores altos em locais distantes da costa como a cidade de Mairiporã, SP, que chamou a atenção por apresentar incidência de 17%. Em Botucatu, SP, a frequência é de 0,9% (LABARTHE, 1997).

No estado do Rio de Janeiro há muitos anos se pesquisa sobre dirofilariose. Em 1971 foi constatado em Niterói 27,8% de casos positivos para microfilárias detectadas no exame de sangue; entretanto, os parasitos não foram identificados (NASCIMENTO & WERMELINGER, 1971). Na década de 90, quando o teste imunoenzimático (ELISA) foi introduzido, 43,4% dos animais foram considerados positivos na região litorânea de Niterói e 8,61% na cidade do Rio de Janeiro (LABARTHE; ALMOSNY; GUERRERO *et al.*, 1997). Porém, ao estudar cães da região serrana (Petrópolis e Teresópolis) foram encontrados animais portadores da doença em frequência suficientemente alta (11/43) para que a dirofilariose fosse considerada uma ameaça à saúde dos cães da região (LABARTHE, 1997).

6.1.4 Exames radiográficos e ultra-sonográficos

Com relação aos achados radiográficos, estes podem estar normais quando a doença é inicial, entretanto, alterações marcantes se desenvolvem rapidamente nos animais, principalmente naqueles com alta carga parasitária. Normalmente, com o progresso da doença o endotélio torna-se enrugado, irregular e hipertrófico,

comprometendo o fluxo sanguíneo laminar. Assim, as artérias pulmonares dilatam-se, tornam-se tortuosas e são melhor avaliadas em uma incidência radiográfica dorsoventral. A hipertensão pulmonar segue a fibrose perivascular e a doença torna-se autoperpetuante com relação à extensão das lesões cardiovasculares. Estas alterações são características de dirofilariose e fazem com que a dirofilariose cause *cor pulmonale* em cães. ROOT & BAHR (1998) alegam que a hipertensão pulmonar, observada na dirofilariose, provavelmente seja a causa mais comum de *cor pulmonale* adquirida em cães.

A realização de radiografias torácicas de dois cães da pesquisa constatou um aumento ventricular direito, dilatação da artéria pulmonar principal, dilatação e tortuosidade das artérias lobares pulmonares e infiltrados pulmonares intersticiais ou alveolares. Estes sinais radiográficos são típicos de dirofilariose, mas não servem como método diagnóstico isolado (HOLMES, 1985; NELSON & COUTO, 1998; ROOT & BAHR, 1998). Portanto, apesar do exame radiográfico não ser eficaz como método diagnóstico, é um exame adicional para confirmar o diagnóstico, quando há suspeita de dirofilariose. Além disso, tal exame mostrou ser importante em classificar a severidade da doença. Nenhum dos dois cães demonstrou alterações radiográficas graves. Entretanto, há evidências de que cães com aumento ventricular direito severo certamente exibem ou exibirão sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva. Quando o aumento cardíaco for moderado, os cães não demonstrarão sinais clínicos. Além disso, sabe-se que o aumento ventricular direito ocorre semanas ou meses antes de aparecerem sinais de insuficiência cardíaca direita congestiva (CALVERT; LOSONSKY; BROWN *et al.*, 1986). Se há insuficiência cardíaca direita, os principais achados radiográficos podem incluir ascite, hidrotórax,

esplenomegalia ou hepatomegalia. Ocasionalmente, os parasitos adultos podem obstruir a veia cava caudal, produzindo sinais de hipovolemia central e congestão caudal (ROOT & BAHR, 1998). Desta forma, o exame radiográfico é relevante ao determinar a severidade da doença, fato extremamente importante em predizer o protocolo terapêutico.

Comparativamente à interpretação radiográfica, a ultra-sonografia é um método mais objetivo para a avaliação cardíaca direita. Pois, nos dois cães examinados, foi eficaz em determinar o tamanho do lume ventricular e também a espessura da parede desta câmara cardíaca, como já descrito por HOLMES (1985). Além disso, este exame pode detectar aumento atrial direito, dilatação arterial pulmonar, além da presença de dirofilárias no ventrículo direito ou na artéria pulmonar principal. Os parasitos, no interior da câmara ventricular direita, aparecem como pequenos focos hiperecóicos. Tal fato é corroborado pelas observações de NELSON & COUTO (1998) e, além disso, estes autores afirmam que os parasitos não podem ser detectados por este exame pelo fato de situarem-se nas artérias pulmonares periféricas.

6.2 Alguns dados epidemiológicos observados no litoral do Paraná, com relação às áreas de estudo

Até a realização desta pesquisa não se dispõe de dados oficialmente registrados que informem sobre a situação do litoral paranaense com relação à dirofilariose ou à infecção por outro filarídeo. No presente trabalho, os resultados obtidos com os 256 animais fornecem informações importantes para indicar que

existem, no mínimo, dois filarídeos nos cães do litoral paranaense: *Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema reconditum*. Além disso, pôde-se constatar que a prevalência de ambos os parasitos varia entre as regiões pesquisadas.

As regiões de Guaratuba, Guaraqueçaba, Ilha das Peças e a zona rural da Praia de Leste apresentaram uma maior ocorrência de cães demonstrando microfilaremia com relação à média geral verificada nas outras regiões. Somente por observação, verificou-se que estas regiões apresentam características gerais semelhantes, como flora e fauna abundantes, alta densidade canina e muitas moradias adentrando na mata nativa. Além disso, por meio da enquete realizada com os proprietários, pôde-se constatar que, regularmente, os proprietários dos cães não tomam medidas contra os endo e ectoparasitos dos seus cães. A Ilha do Mel, apesar de se assemelhar àquelas regiões, revelou um valor de cães microfilarêmicos inferior. Tal fato pode ser elucidado pelo fato dos cães daquela ilha terem sido desverminados, por profissionais da prefeitura responsável pela região, aproximadamente uma semana antes, com uma droga que envolve a associação de tetramisol e disofenol. O tetramisol, por ser semelhante ao levamisol, tem um certo efeito microfilaricida (BRADLEY, 1976).

Uma vez que a *D. immitis* têm destacado papel por ser patogênica, é importante ressaltar que sua presença constatada nas regiões de Guaratuba, Guaraqueçaba, Shangrilá, Pontal do Sul e Ilha das Peças não implica concluir que esteja ausente nas outras áreas litorâneas, uma vez que existe comunicação direta entre as regiões. Entretanto, em Guaraqueçaba e na Ilha das Peças verificou-se, entre os cães pesquisados destas regiões, uma ocorrência de dirofilariose de 20,68% e 15%, respectivamente, que é muito superior à encontrada nas outras

regiões. Esta pesquisa não teve como propósito estudar o bioclima das regiões, mas provavelmente, os fatores ambientais como a temperatura, umidade, e a existência de grandes reservas florestais nativas naqueles locais estão relacionados com a maior densidade de mosquitos e maior prevalência da infecção nos animais. WALTERS (1995) relata que, notadamente, os três fatores mais importantes em influenciar as taxas de prevalência incluem o clima, a disponibilidade de hospedeiros infectados e a presença de vetores competentes. Além disso, na região de Guaraqueçaba, sabe-se da existência de um grande número de animais selvagens que podem ser reservatórios importantes do parasito no local. É provável que um ciclo selvático ocorra naquele local, tendo papel fundamental na manutenção do ciclo doméstico.

Com relação ao perfil da população de cães, este não varia entre as regiões pesquisadas, uma vez que praticamente todos os cães (pertencentes a proprietários ou não) vivem soltos pelos quintais ou ruas. Portanto, todos estão continuamente expostos aos mosquitos e, conseqüentemente, ao risco de se infectarem com *D. immitis*.

O presente trabalho não teve como objetivo pesquisar os vetores de *D. immitis*. Em levantamento bibliográfico também não foi encontrado relato sobre pesquisas dos potenciais vetores da *D. immitis* no litoral do Paraná. Desta forma, não há como saber quantas espécies de mosquito estão envolvidas na transmissão do parasito. Talvez exista apenas uma espécie competente e por isso a prevalência da doença seja baixa. Em Itacotiara, região oceânica de Niterói, RJ, LABARTHE; SERRÃO; MELO *et al.* (1998b) destacaram as seguintes espécies: *Aedes scapularis*, *Aedes taeniorhynchus* e *Culex quinquefasciatus* como possíveis vetores da região.

Destes, apenas o *Aedes scapularis* foi capturado por SANTOS NETO (1997) em uma pesquisa realizada em Morretes, região litorânea do Paraná. LUZ, E. (Comunicação pessoal) cita a existência dos seguintes mosquitos no litoral paranaense: *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis domesticus*; *A.* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi*; *A.* (*Kerteszia*) *cruzei*; *A.* (*Kerteszia*) *bellator*; *A.* (*Arribauzagia*) *fluminensis*; *A.* (*Arribauzagia*) *intermedius*; *A.* (*Arribauzagia*) *maculipes*; *A.* *mediopunctatus*; *Culex quinquefasciatus*; *Culex* (*Melanoconion*) sp.; *Culex* (*Lutzia*) *bigoti*; *Culex* (*Culex*) sp.; *Culex coronator*; *Aedes aegypti*; *A.* *albopictus*; *A.* *scapularis*; *Mansonium* sp. e *Uranotaenia palidiventer*. No final da década de 90, SILVA & LOZOVEI (1998) detectaram a presença de *Aedes* (*Ochlerotatus*) *scapularis* (Rondani, 1848), *Culex* (*Culex*) grupo *coronator* Dyar & Knab, 1906, *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say, 1823 e *Aedes* (*Ochlerotatus*) *crinifer* (Theobald, 1903) como espécies em maior porcentagem, presentes em área preservada de Curitiba, Paraná.

Um fator que pode contribuir em limitar a transmissão da *D. immitis* no litoral paranaense é o programa de controle aos mosquitos da região (*Aedes aegypti*), uma vez que este artrópodo transmite vírus aos humanos. Durante as colheitas de sangue realizadas no litoral paranaense, pode-se observar folhetos explicativos para que recipientes contendo água parada, como pneus, vasos, valas, banhados, entre outros, fossem eliminados. Provavelmente, este método de combate afetem não somente a densidade do *A. aegypti*, mas também a densidade de outros mosquitos e, entre eles, os vetores da *D. immitis*. Este controle da população de mosquitos pode explicar a maior prevalência de *D. reconditum* (transmitido por pulgas de cães e de gatos) detectada nos cães durante esta pesquisa.

Com relação à temperatura média do litoral paranaense, sabe-se que os

meses quentes do verão proporcionam, vários meses de temperaturas diárias superiores a 18° C. A “American Heartworm Society” afirma que nas condições de temperatura citadas acima basta um mês (com temperatura diária acima de 18° C) para permitir que as larvas de *D. immitis* completem seu desenvolvimento, no interior do artrópodo. Como exemplo, cita-se que a temperatura mínima observada nos meses: janeiro, fevereiro, março, abril, novembro e dezembro de 1998, janeiro e fevereiro de 1999 foi maior que 18° C. Isto indica que estes meses foram propícios para o desenvolvimento e transmissão da *D. immitis* (Figuras 17 e 18).

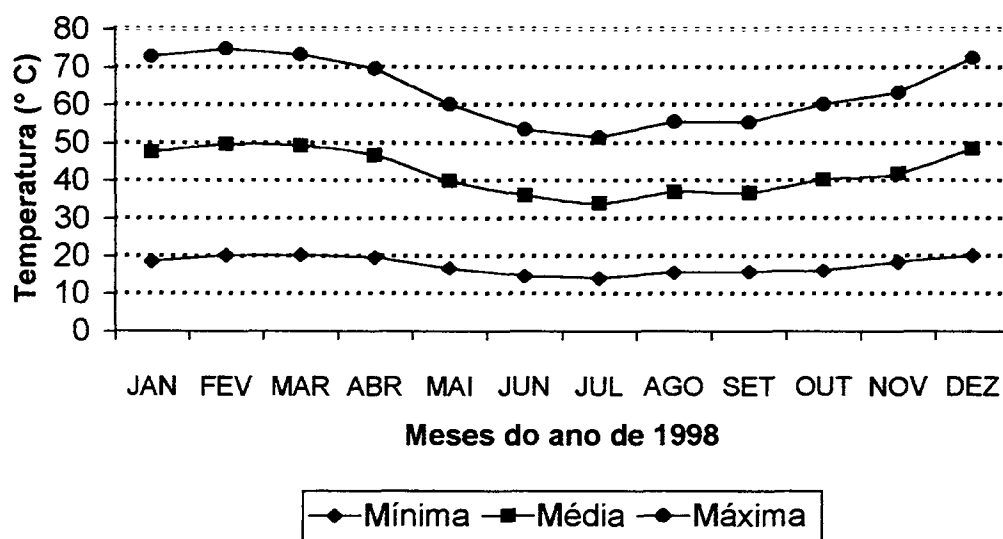


FIGURA 17 – Dados das temperaturas (máxima, mínima e média) obtidos na região de Guaratuba, litoral do Paraná, durante o ano de 1998. (FONTE: SIMEPAR, 1999).

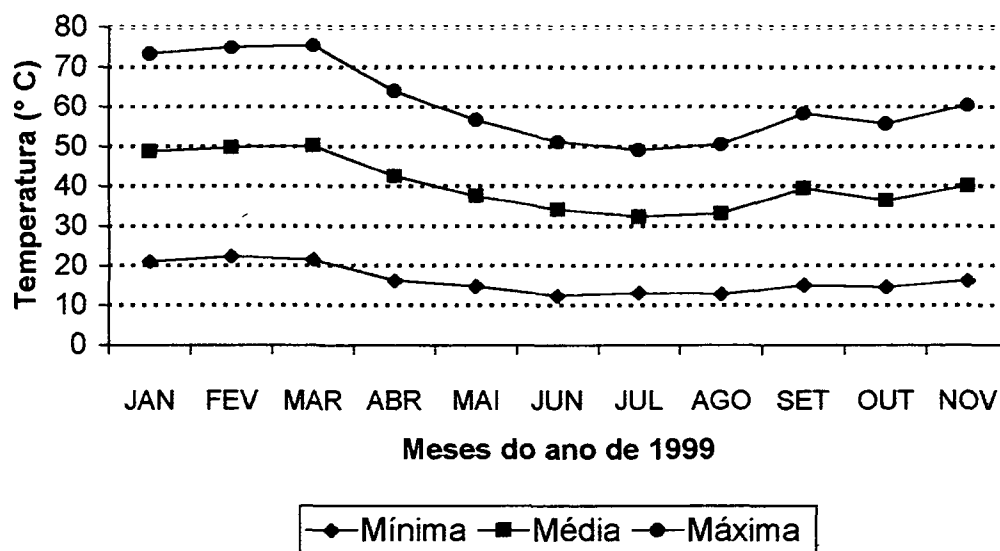


FIGURA 18 – Dados das temperaturas (máxima, mínima e média) obtidos na região de Guaratuba, litoral do Paraná, durante o ano de 1999. (FONTE: SIMEPAR, 1999).

Os achados necroscópicos realizados em 1972 comprovam que a dirofilariose está presente no litoral paranaense, segundo KAVINSKI, L.C. (1999, Comunicação pessoal), entretanto não se sabe ao certo qual era a prevalência naquela época e nem quando foi introduzida. Apesar das informações sobre a prevalência e sobre a distribuição geográfica serem limitadas, hoje pode-se concluir que o litoral paranaense oferece condições satisfatórias para a manutenção do ciclo da *D. immitis* e do *D. reconditum*, permitindo que estes se propaguem pelo litoral e para regiões vizinhas. Outro risco que influi diretamente na propagação da dirofilária é a população de cães que visita o litoral com seus proprietários durante o verão.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A prevalência de dirofilariose no litoral paranaense é de 5,47%, entretanto, há diferenças entre as regiões como Guaraqueçaba e Ilha das Peças, com prevalências de 20,69% e 15,0%, respectivamente; Shangrilá, 8,33%, Guaratuba, 6,12% e Pontal do Sul, 4,76%.
- A prevalência de infecções por *Dipetalonema reconditum* no litoral paranaense é de 22,65%, mas há diferenças entre as regiões como 45,0% na Ilha das Peças, 37,50% em Praia de Leste, 34,69% em Guaratuba, 24,14% em Guaraqueçaba e 23,08% em Antonina. As regiões Morretes, Pontal do Sul, Ipanema e Ilha do Mel apresentaram prevalências inferiores a 22,65%;
- Os resultados desta pesquisa fornecem dados que são o marco inicial para o acompanhamento da propagação da doença e da microfilaremia em cada uma das 11 regiões pesquisadas do litoral paranaense;
- O exame físico não é eficaz para a realização do diagnóstico ou para a sua confirmação, uma vez que a maioria dos cães com dirofilariose no litoral paranaense tem a doença na forma assintomática;
- O teste direto do sangue a fresco é o mais econômico e permite a observação da motilidade das microfilárias. Contudo, não permite realizar a diferenciação das

microfilárias de *Dirofilaria immitis* das de *Dipetalonema reconditum*. Além disso, este teste mostrou ser o menos sensível em detectar microfilárias no sangue;

- As microfilárias mantêm sua motilidade por sete a 12 dias, quando o sangue é armazenado com anticoagulante e sob refrigeração (2 a 4° C);
- O teste de Knott modificado possibilita o estudo das seguintes características morfológicas e micrométricas das microfilárias: mensuração (comprimento e diâmetro), formato da extremidade posterior e da anterior e detecção do gancho cefálico. A diferenciação das microfilárias foi melhor realizada por meio deste teste;
- As microfilárias detectadas no sangue podem ser diferenciadas por meio dos dados referentes às mensurações e à presença ou ausência de gancho cefálico. Há diferenças no formato da extremidade posterior e da anterior e diferenças na disposição das estruturas internas do corpo das microfilárias, mas estes caracteres não possibilitaram a diferenciação das mesmas;
- As microfilárias detectadas e diferenciadas pelo teste de Knott modificado foram as de *Dirofilaria immitis* e de *Dipetalonema reconditum*. Adicionalmente, detectou-se a presença de um terceiro tipo de microfilária, indicando, possivelmente, a existência de um terceiro parasito, pertencente à superfamília Filarioidea, na região estudada. Este último, estava presente em 4,68% dos cães pesquisados;

- O teste de Knott modificado, com relação ao teste de filtração, exige mais tempo para a preparação. Entretanto, uma maior quantidade de amostras podem ser preparadas simultaneamente. Além disso, é uma técnica padronizada e mais barata (quando o laboratório já dispõe dos seguintes materiais: balança, centrífuga, tubos de ensaio e pipetas Pasteur);
- O teste de Knott modificado foi tão sensível em detectar microfilárias de *D. immitis* quanto o teste de filtração. Entretanto, ao se considerar todos os tipos de microfilárias, o teste de filtração foi mais sensível;
- O teste de filtração é mais caro que o de Knott porque as membranas filtro devem ser importadas e, para cada exame, uma membrana filtro nova deve ser utilizada. O preparo do teste de filtração é mais rápido do que o de Knott, mas a leitura da membrana filtro deve ser realizada imediatamente porque a mesma resseca e inutiliza o material;
- A membrana filtro utilizada, muitas vezes reteve os restos celulares da hemólise na sua superfície. Nestes casos, o estudo dos caracteres morfológicos das microfilárias ficou dificultado. Além disso, a extremidade posterior de algumas microfilárias entra nos orifícios da membrana, dificultando a mensuração;
- Os testes sorológicos utilizados, Witness® (Synbiotics) e Snap® (IDEXX), quando comparados com os testes parasitológicos, são mais caros. Mas são testes mais

práticos e rápidos de serem realizados. Particularmente, o teste Snap® foi o mais sensível em diagnosticar dirofilariose, notadamente, nos casos de infecção oculta;

- Devido à grande quantidade de infecções ocultas (28,57%) detectadas nos cães do litoral paranaense, recomenda-se, para o diagnóstico de dirofilariose naquela região, a utilização dos testes imunológicos. Os testes detectantes de microfilárias, assim como os exames radiográficos e ultra-sonográficos, podem ser utilizados para confirmar o diagnóstico, para determinar se o tratamento microfilaricida é necessário e para avaliar a severidade da doença;
- Não deve haver trânsito de cães do litoral para outras localidades do estado e vice-versa, para impedir a disseminação dos parasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, G.L.G.; VICENTE, J.J. *Dipetalonema reconditum* (GRASSI, 1890), *Dipetalonema grassii* (NOÉ, 1907) e *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) em cães na cidade do Rio de Janeiro (Nematoda-filarioidea). *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, v. 23, p. 9-12. 1982.
2. ALVES, L.C.; SILVA, L.V.; FAUSTINO, M.A. *et al.* Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 587-590, sep./oct. 1999.
3. ANDERSON, R.C. *Nematode parasites of vertebrates*. Wallingford, UK: C.A.B. International, 1992. 578 p. p. 437-520.
4. ANGUS, B.W. Periodicity exhibited by microfilariae of *D. immitis* in Southeast Queensland. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, v. 57, p. 101-102. 1981.
5. ATKINS, C.E.; ATWELL, R.B.; DILLON, R. *et al.* American Heartworm Society Guidelines – Guidelines for the diagnosis, treatment, and prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats. *The Compendium*, Lawrenceville, p. 422-429, apr. 1997.
6. ATWELL, R.B. Early stages of disease of the peripheral pulmonary arteries in canine dirofilariasis. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, v. 56, p. 157-159, apr. 1980.
7. AUTEFAGE, A. Distribution of melarsomine injected intramuscularly in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 51, n. 6, p. 901-904, jun. 1990.
8. BEMRICK, W.J.; BUCHILI, B.L.; GRIFFITHS, H.J. Development of *Dirofilaria immitis* in *Anopheles quadrimaculatus* after exposure of the microfilariae to a freezing temperature. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 51, n. 6, p. 954-957, dec. 1965.
9. BEMRICK, W.J.; SANDHOLM, H.A. *Aedes vexans* and other potential mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Minnesota. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 52, n. 4, p. 762-767, aug. 1966.
10. BLAGBURN, R.L. Microfilaricidal therapy: review and update. *Veterinary Medicine*, Denville, v. 89, n. 7, p. 630-638, jul. 1994.
11. BLAND, A.; McTIER, T.; TREEMAN, K.P. *et al.* Evaluation of the ICT GOLDTMHW heartworm antigen test kit. In: *Proceedings of the Heartworm Symposium '95* (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 135-140.
12. BORING, J.G. Radiographic diagnosis of heartworm disease. In: *Proceedings of the Heartworm Symposium '74*. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975b. 161 p. p. 32-37.
13. BOWMAN, D.D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 7. ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. 414 p.

14. BRADLEY, R.E. Levamisole resinate as a *Dirofilaria immitis* microfilaricide in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 169, n. 3, p. 311-316, aug. 1976.
15. BRADLEY, T.J.; NAYAR, J.K. An ultrastructural study of *Dirofilaria immitis* infection in the malpighian tubules of *Anopheles quadrimaculatus*. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 73, n. 5, p. 1035-1043. 1987.
16. BRADLEY, T.J.; SAUERMAN, D.M.; NAYAR, J.K. early cellular responses in the malpighian tubules of the mosquito *Aedes taeniorhynchus* to infection with *Dirofilaria immitis* (nematoda). *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v.70, n. 1, p. 82-88. 1984.
17. BROWN, H.W. Some Observations on the epidemiology of the dog heart worm (*Dirofilaria immitis*). *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 23, n. 6, p.570, dec. 1937.
18. CALVERT, C.A.; LOSONSKY, J.M.; BROWN, J. *et al.* Comparisons of radiographic and electrocardiographic abnormalities in canine heartworm disease. *Veterinary Radiology*, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 2-7. 1986.
19. CALVERT, C.A.; RAWLINGS, C.A. Diagnosis and management of canine heartworm disease. In: KIRK, R.W. *Current Veterinary Therapy VIII*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1983. p. 348-359.
20. CASE, J.L.; TANNER, P.A.; KEISTER, K.M. *et al.* A clinical field trial of melarsomine dihydrochloride (RM340) in dogs with severe (Class 3) heartworm disease. In: *Proceedings of the Heartworm Symposium '95* (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 243-250.
21. CHALIFOUX, L.; HUNT, R.D. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 158, n. 5, p. 601-605, 1971.
22. CHRISTENSEN, B.M.; FORTON, K. Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 72, n. 2, p. 220-225. 1986.
23. COOLEY, A.J.; CLEMMONS, R.M.; GROSS, T.L. Heartworm disease manifested by encephalomyelitis and myositis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 190, n. 4, p. 431-432, feb. 15, 1987.
24. CORNEL, W.D.; ABID, H.N. *Dirofilaria immitis* infection in cats. *Companion Animal Practice – Feline Cardiology/Parasitology*, Santa Barbara, v. 2, n. 5, p. 23-25, may. 1988.
25. CORWIN, R.M. Update on canine heartworm disease. In: 50 th Annual Meeting American Animal Hospital Association (1983, South Bend). *Proceedings...* South Bend, 1983. 407 p. p. 259-261.
26. COURTNEY, C.H.; JACKSON, R.F. Recurrence of microfilariae of *Dirofilaria immitis* after microfilaricidal therapy without an adulticide. In: *Proceedings of the Heartworm Symposium '74*. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 87-88.

27. DILLON, A.R.; BRAUNER, W.R.; HANRAHN, L. Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 113-114.
28. DILLON, A.R.; WARNER, A.E.; MOLINA, R.M. Pulmonary parenchymal changes in dogs and cats after experimental transplantation of dead *Dirofilaria immitis*. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 97-101.
29. DILLON, R. Canine heartworm disease. In: 51 st Annual Meeting American Animal Hospital Association (1984, South Bend). *Proceedings...* South Bend, 1984. p. 23-25.
30. DOW, S.W.; LAPPIN, M.R. Immunopathologic consequences of infectious disease. In: BONAGURA, J.D.; KIRK, R.W. *Kirk's Current Veterinary Therapy XII*. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 267-271.
31. DUNAVENT, B.; KEISTER, M.D.; TANNER, P. *et al.* Correlation between heartworm disease classification, serum antigen concentration, and associated clinical pathology values. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 221-232.
32. FELDMAN, R.G.; HOLDEN, M.J. Dirofilariasis in man. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Chicago, v. 165, n. 15, p. 929, nov. 1974.
33. FORTON, K.F.; CHRISTENSEN, B.M.; SUTHERLAND, D.R. Ultrastructure of the melanization response of *Aedes Trivittatus* against inoculated *Dirofilaria immitis* microfilariae. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 71, p. 331-341. 1985.
34. FUJITA, K.; TSUKIDATE, S. Allergen concentration in *Dirofilaria immitis* (Nematoda). *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 70, n. 2, p. 313-314. 1984.
35. GARLICK, N.L. Management of canine Heartworm. *Canine Practice*, Santa Barbara, v. 2, n. 1, p. 20-30, jan./feb. 1975.
36. GENCHI, C. BASANO, L.F.; BANDI, C. *et al.* Factors influencing the spread of heartworms in Italy. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 65-71.
37. GRAUER, G.F.; CULHAM, C.A.; DUBIELZIG, R.R. *et al.* Experimental *Dirofilaria immitis*-associated glomerulonephritis induced in part by in situ formation of immune complexes in the glomerular capillary wall. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 75, n. 4, p. 585-593. 1989.
38. GRIEVE, R.B.; BROOKS, B.; BABISH, J.G. *et al.* Lymphocyte function in experimental canine dirofilariasis: B-cell responses to heterologous antigen. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 68, n. 2, p. 341-343. 1982.
39. GUERRERO, J.; RODENAS, A.; GUTIERREZ, J. *et al.* The extension of the prevalence of *Dirofilaria immitis* in Cataluña, Spain. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 73-77.

40. HAHN, N. Parasitas do sangue. In: SLOSS, M.; ZAJAC, A.M.; KEMP, R.L. *Parasitologia Clínica Veterinária*, 6. ed., São Paulo: Manole, 1999. 198 p. p. 101-120.
41. HAYASAKI, M. Re-migration of fifth-stage juvenile *Dirofilaria immitis* into pulmonary arteries after subcutaneous transplantation in dogs, cats, and rabbits. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 82, n. 5, p. 835-837. 1996.
42. HOLMES, R.A. Techniques to aid in the radiographic diagnosis of heartworm disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 186, n. 10, p. 1063-1067, may. 1985.
43. HONG, X. Q.; MEJIA, J.S.; NKENFOU, C. *et al.* A Promising recombinant antigen for the early detection of heartworm infection. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 141-146.
44. HOUSE, C.; GLOVER, F. Evaluation of an improved filter test for microfilariae detection. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975b. 161 p. p. 19-20.
45. IBGE, *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, Contagem da população, v. 1, p. 533. 1996.
46. IPARDES, *Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social*. Zoneamento Ecológico-Econômico da APA de Guaraqueçaba, Curitiba, v. 2, nov. 1997.
47. JACKSON, R.F. 1975a. The venae cavae syndrome. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 48-50.
48. JACKSON, R.F. 1975b Treatment of the asymptomatic dog. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 51-55.
49. JACKSON, W.F. Radiographic examination of the heartworm infected patient. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 154, n. 15, p. 380-382. 1969.
50. JACKSON, W.F.; OTTO, G.F. Detection and differentiation fo microfilariae. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 21-22.
51. JOINER, G.N.; JARDINE, J.H. Canine filariasis in a central Texas County. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.157, n. 12, p. 2100-2103. 1970.
52. KAVINSKY, L.C. Comunicação pessoal. Clínica Veterinária São Bernardo. Rua Munhoz da Rocha, Curitiba, Paraná. 1999.
53. KEISTER. D.M.; TANNER, P.A.; MEO, N.J. Immiticide® review of discovery, development, and utility. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 201-219.
54. KNIGHT, D. Heartworms in dogs and cats: Reconsidering your treatment options. *Veterinary Medicine*, Denville, v. 89, n. 7, p. 618-619, jul. 1994.

55. KNIGHT, D.H. Guidelines for diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. In: BONAGURA, J.D.; KIRK, R.W. *Kirk's Current Veterinary Therapy XII*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 879-887.
56. KNIGHT, D.H. Heartworm disease. In: ETTINGER, S.J. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. v.1, 2. ed., Philadelphia: Saunders. 1983. 2145 p. p. 1046-1047.
57. KNIGHT, D.H.; LOK, J.B. Seasonal timing of heartworm chemoprophylaxis in the united states. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 37-42.
58. KOZEK, W.J. Ultrastructure of the microfilaria of *Dirofilaria immitis*. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 57, n. 5, p. 1052-1067, oct. 1971.
59. KOZEK, W.J.; VAZQUEZ, A.E.; GONZALEZ, C. *et al.* Prevalence of canine filariae in Puerto Rico and the Caribbean. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 55-63.
60. KUME, S. Experimental observations on seasonal periodicity of microfilariae. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 26-31.
61. LABARTHE, N.V. Dirofilariose canina: diagnóstico, prevenção e tratamento adulticida. *Clínica Veterinária*, São Paulo, ano II, n 10, set./out. 1997.
62. LABARTHE, N.V.; ALMOSNY, N.; GUERRERO, J. *et al.* Description of the occurrence of canine dirofilariasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 1, p. 47-51, jan./feb. 1997.
63. LABARTHE, N.V.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F. *et al.* 1998b. Potencial vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, oceanic region of Niterói municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 425-432, jul./aug. 1998.
64. LABARTHE, N.V.; SERRÃO, M.L.; MELO, Y.F. *et al.* 1998a. Mosquito frequency and feeding habits in na enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 145-154, mar./apr. 1998.
65. LARSSON, M.H.M.A.; IWASAKI, M.; LARSSON, C.E. *et al.* Aspectos clínicos e diagnósticos da dirofilariose canina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, São Paulo, v. 10, n. 5, p. 85-91. 1988.
66. LARSSON, M.H.M.A.; MENG, M.C.; RECHE JÚNIOR, A. *et al.* Estudo da variação da microfilaremia em cães infestados por *Dirofilaria immitis*, *Brazilian Journal of Veterinary Research*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 114-119. 1995.
67. LARSSON, M.H.M.A.; PEREIRA, L.; DOMINGOS, L.O. *et al.* Novo tratamento da dirofilariose canina: dicloridrato de melarsomina – dados preliminares. In: XIX Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (1997, Curitiba). *Anais...* Curitiba. 1997. 57 p. p.14.

68. LEIB, M.S.; ALLEN, T.A.; HUSTED, P.W. Acute renal failure associated with thiacetarsamide sodium treatment for adult heartworms in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, South Bend, v. 20, p. 973-978, nov./dec. 1984.
69. LEVINE, B.G. Dirofilariasis. In: KIRK, R.W. *Kirk's Current Veterinary Therapy V*. Philadelphia: Saunders, 1974. p. 298-305.
70. LILLIS, W.G. *Dirofilaria immitis* in dogs and cats from south-central New Jersey. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 50, n. 6, p. 802, dec. 1964.
71. LIMA, J.D.; COSTA, H.M.A. Periodicidade das microfilárias de *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1890). *Arq. Esc. Vet. U.F.M.G.*, Belo Horizonte, v. 24, n. 2. p. 125-136. 1972.
72. LOK, J.B.; KNIGHT, D.H. Macrolide effects on reproductive function in male and female heartworms. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 165-170.
73. LUDLAM, K.W.; JACHOWSKI, L.A.; OTTO, G.F. Potencial vectors of *Dirofilaria immitis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 157, n. 10, p. 1354-1359. 1970.
74. LUZ, E. Comunicação pessoal. Professor Titular Sênior do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. 1999.
75. MAACK, R. Geografia física do estado do Paraná. Banco de Desenvolvimento do Paraná, Universidade Federal do Paraná, Instituto de Biologia e Pesquisa Tecnológica. Curitiba, 1968.
76. MACÊDO, F.C.; LABARTHE, N.L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* Suscetibility of *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) to *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), an emerging zoonosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 435-437, jul./aug. 1998.
77. MANTOVANI, A. Transplacental transmission of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 52, n. 1, p. 116, feb. 1966.
78. McCALL, J.W. ; CALVERT, C.A.; RAWLINGS, C.A. Heartworm infection in cats: A life-threatening disease. *Veterinary Medicine*, Denville, p. 639-647, jul. 1994.
79. McTIER, T.L. A Guide to selecting adult heartworm antigen test kits. *Veterinary Medicine*, Denville, v. 89, n. 6, p. 528-544, jun. 1994.
80. McTIER, T.L.; McCALL, J.W.; SUPAKORNDEJ, N. Features of adult heartworm antigen test kits. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 115-120.
81. MILLER, M.W.; KEISTER, D.M.; TANNER, P.A. *et al.* Clinical efficacy of melarsomine dihydrochloride (RM340) and thiacetarsamide in dogs with moderate (class 2) heartworm disease. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 233-241.

82. MUSSELMAN, E. Pulmonary vascular hemodynamic studies in canine dirofilariosis. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 43-44.
83. NAPPI, A.J.; CHRISTENSEN, B.M. Hemocyte cell surface changes in *Aedes aegypti* in response to microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 72, n. 6, p. 875-879. 1986.
84. NASCIMENTO, M.D.; WERMELINGER, L.M. Incidência de microfilárias em cães Niterói (Bairro de São Francisco). *Revista de Medicina Veterinária*, São Paulo, n. 7, p. 138-143. 1971.
85. NELSON, R.W. & COUTO, G. *Small animal internal medicine*. Philadelphia: Mosby, 1998. p. 162-179.
86. NEWTON, W.L.; WRIGHT, W.H. The occurrence of a dog filariid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 42, p. 246-258. 1956.
87. NUNES, A.A. Ocorrência de *Dirofilaria immitis* em gato no litoral Norte de São Paulo. In: XII Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA (1989, Belo Horizonte). *Anais...* Belo Horizonte. 1989. p. 16.
88. OLSEN, O.W. *Animal Parasites*. 3. ed., Baltimore: University Park Press, 1974. p. 399-519.
89. OTTO, G.F. 1975a. Preface. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p.
90. OTTO, G.F. 1975b. Changing geographic distribution of heartworm disease in the United States. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 1-2.
91. OTTO, G.F. 1975c. Occurrence of the heartworm in unusual locations and in unusual hosts. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 6-13.
92. PACHECO, G. Progressive changes in certain serological responses to *Dirofilaria immitis* infection in the Dog. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 52, n. 2, p. 311-317, apr. 1966.
93. PINTO, C. *Doenças infecciosas e parasitárias dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Ed. Científica, 1944. p. 539-543.
94. RAWLINGS, C.A. *et al.* Pulmonary thromboembolism and hypertension after thiacetarsemide vs. melarsomine dihydrochloride treatment of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 54, n. 6, p. 920-925. 1993.
95. RAWLINGS, C.A.; CALVERT, C.A. Heartworm disease. In: ETTINGER, S.J. FELDMAN, E.C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 4. ed., v. 1, Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. 1082 p. p. 1046-1067.

96. RAWLINGS, C.A.; McCALL, J.W. Melarsomine: A new heartworm adulticide. *The Compendium*, Lawrenceville, p. 373-379, apr. 1996.
97. ROCHA A.; TARRAGA, K.M.; FERREIRA, F. 1997a. Ocorrência da dirofilariose canina detectada através do teste elisa em soros de animais analisados no PROVET. In: XIX Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (1997, Curitiba). *Anais...* Curitiba, 1997. 57 p. p. 18.
98. ROCHA A.; TARRAGA, K.M.; FERREIRA, F. 1997b. Ocorrência da dirofilariose canina em uma população de 146 animais da raça Dogue Alemão submetidos às mesmas condições de manejo, utilizando-se teste ELISA. In: XIX Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (1997, Curitiba). *Anais...* Curitiba, 1997. 57 p. p. 18.
99. ROOT & BAHR, D.E. The heart and great vessels. In: THRALL, D.E. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. 3. ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. 663 p. p. 335-353.
100. RYAN, W.G.; GROSS, S.J.; SOLL, M.D. Diagnosis of feline heartworm infection. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 121-126.
101. RYAN, W.G.; NEWCOMB, K.M. Prevalence of feline heartworm disease – a global review. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 79-86.
102. SANTOS NETO, L.G. *Aspectos ecológicos de mosquitos adultos (Diptera, Culicidae) de uma área restrita da floresta Atlântica, Morretes, Paraná, Brasil*. Curitiba, 1997. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
103. SAWYER, T.K. 1975a. Seasonal fluctuations of microfilariae in two dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 23-25.
104. SAWYER, T.K. 1975b. The venae cavae syndrome in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 45-47.
105. SCOLES, G.A.; DICKSON, S.L. New foci of canine heartworm associated with introductions of new vector species. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 27-35.
106. SHEEN, D.; SWEENEY, K.; JONES, C.K. Heartworm testing: comparing results of ELISA with filter technique and necropsy findings. *Veterinary Medicine*, Denville, v. 80, n. 1, p. 49-51, jan. 1985.
107. SILVA, M.A.N. DA; LOZOVEI, A.L. Mosquitos (Diptera, Culicidae) capturados com isca humana em área preservada de Curitiba, Paraná. *Revista brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 15, n. 4, p. 965-976, nov. 1998.

108. SIMPSON, C.F.; JACKSON, R.F. Pathophysiology of heartworm disease. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '74. (1974, Auburn). *Proceedings...* Auburn, 1975. 161 p. p. 38-42.
109. STROMBERG, B.E.; PROUTY, S.M.; AVERBECK, G.A. *et al.* Six decades of heartworm in Minnesota. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 49-54.
110. TASHJIAN, R.J.; LIU, S.K.; YARNS, D.A. *et al.* Angiocardiography in canine heartworm disease. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 31, n. 3, p. 415-436, mar. 1970.
111. TAYLOR, A.E.R. The development of *Dirofilaria immitis* in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Helminthology*, Wallingford, v. 34, n. 1, p. 27-38. 1960.
112. TODD, K.S.; HOWLAND, T.P. Transplacental transmission of *Dirofilaria immitis* microfilariae in the dog. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 69, n. 2, p. 371, apr. 1983.
113. TROPPEMAIR, H. Perfil fitoecológico do estado do Paraná. *Boletim de Geografia*. ISSN 0102-5198. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Geografia, ano 8, n. 1, p. 67-79, set. 1990.
114. UTROSKA, B. A Heartworm survey and concurrent comarison of in-house diagnostic tests. *Canine Practice – Parasitology/Immunology*, Santa Barbara, v. 13, n. 3, p. 20-30, may./jun. 1986.
115. WALTERS, L. Risk Factors for heartworm infection in northern California. In: Proceedings of the Heartworm Symposium '95 (1995, Batavia, IL). *Proceedings...* Batavia, 1995. 334 p. p. 5-26.
116. WARD, J. W.; FRANKLIN, M.A. Further studies on the occurrence of the dog heart worm, *Dirofilaria immitis* in dogs in Mississippi. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 39, n. 5, p. 570-571, feb. 1953.
117. WRIGHT, J.C.; HENDRIX, C.M.; BROWN, R.G. Dirofilariasis zoonosis update. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 194, n. 5, p. 644-648, mar. 1989.
118. WYLIE, J.P. Detection of microfilariae by a filter techique. *Journal of the Americam Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 156, n. 10, p. 1403-1405. 1973.
119. YEN, C.H. Studies on *Dirofilaria immitis* Leidy, with special reference to the susceptibility of some Minnesota species of mosquitoes to the infection. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 24, n. 3, p. 189-205, jun. 1938.

ANEXO I

Nº FICHA: _____

Data: _____

FICHA CADASTRAL

Nome do Proprietário: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Telefone: _____

Nome do Paciente: _____ Sexo: F ☐ M ☐

Idade: _____ Raça: _____

Cor da pelagem: escura ☐ mista ☐ clara ☐Tipo da pelagem: curta ☐ média ☐ longa ☐**Questionário para o proprietário**

1. Seu cão vive a maior parte do dia fora de casa ? Sim ☐ Não ☐
2. Dorme fora de casa ? Sim ☐ Não ☐
3. Seu cão sempre morou nesta região ? Sim ☐ Não ☐
Se não, há quanto tempo está no litoral paranaense?
4. Quando seu cão foi desverminado pela última vez e qual foi o vermífugo ?
5. Com relação à renda mensal da família:
☐ entre 1 a 3 salários mínimos
☐ entre 4 a 6 salários mínimos
☐ entre 7 a 9 salários mínimos
☐ mais de 10 salários mínimos

Exame físico do paciente

ANEXO II

Quadro com as mensurações médias das microfilárias detectadas no sangue dos dos animais da pesquisa, por meio do teste de Knott modificado (1939) por Newton e Wright (1956).

NUMERO DA AMOSTRA	MESNURAÇÃO DO COMPRIMENTO EM OBJETIVA DE 10 X	MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO EM OBJETIVA DE 40 X	MENSURAÇÃO DA LARGURA EM OBJETIVA DE 40 X
AMOSTRAS DO GRUPO I (<i>Dipetalonema reconditum</i>)			
9	286	288,1	5,3
10	261,4	270,1	4,2
15	264,6	255,9	3,16
22	257	259	3,28
29	258,3	270,1	4,74
55	260,4	269,6	3,16
60	254,5	272,3	3,7
63	252	259,2	3,5
64	255,7	266	3,7
72	252	264	3,4
74	259,1	271,3	4,6
75	241,9	258,4	3,2
77	270,9	276,5	4,7
78	239,4	268,6	3,3
79	277,2	278	4,5
81	254,5	261	3,6
90	260	274	4,1
91	252	258,4	3,16
99	252	268,6	3,16
101	246,6	253	4,8
102	243,6	260,1	4,6
103	246,6	256,4	4,74
105	264,6	263,3	4,8
112	258,3	265,4	4,5
122	243,6	257	3,6
125	259,5	261	3,8
126	236,2	244,9	3,16
127	241,4	254	3,16
136	264,6	276,8	4,5
165	257	267	5
167	264,6	273,5	4,4
172	264,6	270,8	4,3
182	277,2	284,4	4,74
187	254,5	269,2	4,5
194	268,1	278	5
196	254,5	264,4	5
197	283,5	287,56	4,74
202	252	263,8	4,74
210	249,4	255,3	4,3

NÚMERO DA AMOSTRA	MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO EM OBJETIVA DE 10 X	MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO EM OBJETIVA DE 40 X	MENSURAÇÃO DA LARGURA EM OBJETIVA DE 40 X
214	258,3	257,5	5
229	262,7	267,6	4,4
230	270,9	278	4,74
231	267,1	265,4	4,3
233	269,6	279,9	4,5
242	239,4	246,4	4,5
243	250,7	257,2	3,2
249	255,5	261,8	3,9
250	274	276,5	4,2
251	255,1	265,4	4,1
254	268,7	260,1	3,8
255	272,4	252	3,8
AMOSTRAS DO GRUPO II (<i>Dirofilaria immitis</i>)			
14	306,18	314	6,32
35	328,86	331,8	6,32
111	327,6	343,4	7,12
121	321,3	336,5	6,31
217	340,2	345	6,32
225	332,9	335,9	6,32
226	322,5	332,7	6,32
236	340	342,4	6,32
252	332,8	342	8,9
AMOSTRAS DO GRUPO III (parasito da superfamília Filarioidea)			
6	304,4	309,6	5,6
62	330,12	347	6,32
129	338,9	348,5	5,56
145	336,7	345,8	6,12
156	333,9	336,9	6,32
159	331,1	341,2	6,32
168	315	327,9	5,2
174	310,7	323,3	5,2
199	315	331,8	6,32
224	333,9	338,7	6,32
227	308,7	321	5,6

Observação: Além das 71 amostras citadas no quadro acima, o teste de filtração detectou nove amostras adicionais que apresentaram microfilárias, perfazendo um total de 80 amostras com microfilárias no sangue.